

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, HISTOLOGÍA Y NEUROCIENCIA
FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DEL
DESARROLLO PRENATAL DEL HIPOCAMPO
HUMANO**

**EMILIO GONZÁLEZ ARNAY
2015**

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, HISTOLOGÍA Y NEUROCIENCIA
FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DEL
DESARROLLO PRENATAL DEL HIPOCAMPO
HUMANO**

**Memoria de Tesis Doctoral presentada por Emilio González
Arnay para optar al grado de Doctor en Medicina por la
Universidad Autónoma de Madrid**

DIRECTOR:
DR.FRANCISCO CLASCÁ CABRÉ. Universidad Autónoma de
Madrid
DIRECTORA:
GUNDELA MEYER. Universidad de La Laguna

**PROF. DR. DON FRANCISCO CLASCÁ CABRÉ, CATEDRÁTICO
DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA DE LA FACULTAD
DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

CERTIFICA:

**QUE Don Emilio González Arnay, con DNI 54059509-X ha realizado
bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado “ ESTUDIO
INMUNOHISTOQUÍMICO DEL DESARROLLO PRENATAL DEL
HIPOCAMPO HUMANO” con el máximo rigor y aprovechamiento.**

Dado que la presente Memoria reúne las adecuadas condiciones para
constituir una tesis doctoral, una vez revisada, autorizo la presentación de
la misma por encontrarla apta para su defensa ante un tribunal

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firmo el
presente documento en Madrid, el 17 de agosto de 2015.

Firmado: Doctor Francisco Clascá Cabré

Dña. Gundela Meyer, Catedrática de Anatomía de la Facultad de Medicina de la Universidad de La Laguna, con DNI 23762321-D

CERTIFICA:

Que **Don Emilio González Arnay**, con DNI 54059509-X ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado **“ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DEL DESARROLLO PRENATAL DEL HIPOCAMPO HUMANO”** con el máximo rigor y aprovechamiento.

Dado que la presente Memoria reúne las adecuadas condiciones para constituir una tesis doctoral, una vez revisada, autorizo la presentación de la misma por encontrarla apta para su defensa en un tribunal.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firmo el presente documento en San Cristóbal de La Laguna, el 17 de Agosto de 2015.

Firmado: Doctora Dña. Gundela Meyer

A Matilde y Emilio, que trascenderán por sus actos

y a Mingo, que vale cien hombres como yo

AGRADECIMIENTOS

Al personal médico y técnico del servicio de Anatomía Patológica y la sección de Citología del HUC, a mis amigas y maestras Miriam González, Carolina Hernández, Sonia García y Carolina Medina, a Matilde de la Rosa, Rosa María Arnay, Ana Luisa González, Víctor Galán, Felipa Bautista, Ciona González, Raquel Ruiz, Adrián Gómez, Laura Pérez y, sobre todo, a Yolanda Marcelino les debo el privilegio de haber recorrido con ellos parte de mi vida. Lo que les debo individualmente a cada uno de ellos a nadie más concierne pero mi gratitud debe quedar por escrito por si algún día caigo en la tentación del olvido.

A Alejandro Brito, Noé Liria, María Alonso, Nieves Hernández, Rosa Rodríguez, Bea Esquivel, Sandra Afonso, Yami Quintero, David Robayna, Cristina Martín, Eduardo Salido, Dácil González, Idaira Expósito y Leynis Martínez les debo el privilegio de poder llamarles mis compañeros.

A Gundela Meyer le debo el privilegio de haber compartido infinitas horas de su tiempo, dedicadas a la transmisión del conocimiento sólo por el hecho de que ése conocimiento existe y merece ser transmitido a quién lo desee. A Francisco Clascá le debo el privilegio de poder llevar a cabo en la UAM un proyecto que en mi Universidad de origen me estaba vedado.

A Domingo González, Sofía Piñero, Pedro Laynez, Román Esquerro, Javier Pérez, Sarai Fajardo, Ana Hernández y Mariano González les debo el privilegio de haber podido elegir a mi familia, la inmensa suerte de no caminar nunca solo y el feroz orgullo de haber sido reclamado a su lado cuando ellos han tenido que cruzar el desierto.

A Matilde Arnay y Emilio González, mis padres, les debo el privilegio de haber sido criado, educado, apoyado, auxiliado, sostenido y tantas veces mimado por dos personas que poseen la rara virtud de transformar todo lo que tocan en algo un poquito mejor. Ellos me enseñaron el amor por la Tierra y el Hombre que la habita y espero ser un digno depositario de su herencia.

Y, claro, a la memoria de Henry Gustav Molaison (1926-2008).

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

I) ANATOMÍA DEL HIPOCAMPO DE LOS MAMÍFEROS	1
I.1. Anatomía macroscópica	2
I.2. Estructura histológica	7
I.3. Conexiones	13
I.3.a EFERENCIAS	13
I.3.b AFERENCIAS	15
I.3.b.1 Aferencias corticales	15
I.3.b.2 Aferencias no corticales	18
I.3.c EL FÓRNIX	20
I.3.d EL INDUSEUM GRISEUM	24
I.4. Irrigación	24
I.5. El Hipocampo dorsal, el Hipocampo ventral y el Hipocampo intermedio.	27
II) DESARROLLO DEL HIPOCAMPO	30
II.1. Introducción al desarrollo del hipocampo	30
II.1.a. NEUROGÉNESIS EN EL GIRO DENTADO	30
II.2. La génesis del hipocampo de rata: los trabajos de Joseph Altman y Shirley Bayer	33
II.3. Desarrollo del hipocampo en primates y humanos	35
II.3.a. LA MADURACIÓN DEL HIPOCAMPO DE LOS PRIMATES...	35
II.3.b. EL HIPOCAMPO HUMANO EN DESARROLLO	36
II.3.b.1 Período embrionario y fetal	36
II.3.b.2 El desarrollo postnatal del hipocampo a nivel macroscópico	38
Giro dentado	
Asta de Amón	
III) EL CORTICAL HEM, p73 Y LAS CÉLULAS DE CAJAL-RETZIUS EN EL DESARROLLO DEL HIPOCAMPO	40
III. 1. El cortical hem	40
III. 2. Las neuronas de Cajal-Retzius	42
III. 3. El papel de Reelin y las neuronas de Cajal Retzius en el desarrollo del hipocampo	44
IV) FUNCIONES DEL HIPOCAMPO	46

IV.1. Aplicaciones clínicas	49
------------------------------------	-----------

OBJETIVOS	51
------------------	-----------

MATERIAL Y MÉTODOS	55
---------------------------	-----------

I) MATERIAL	57
--------------------	-----------

<i>I. 1 Material humano</i>	57
-----------------------------	-----------

<i>I. 2 Material murino</i>	58
-----------------------------	-----------

II) MÉTODOS	58
--------------------	-----------

<i>II.1 Tallado y selección de secciones</i>	58
--	-----------

<i>II.2 Inclusión en parafina</i>	60
-----------------------------------	-----------

<i>II.3 Inmunohistoquímica</i>	60
--------------------------------	-----------

<i>II.4 Tinción histológica</i>	62
---------------------------------	-----------

<i>II.5 Inmunofluorescencia</i>	62
---------------------------------	-----------

<i>II.6 Reconstrucciones tridimensionales</i>	63
---	-----------

<i>II.7 Métodos de crianza y selección de los modelos animales</i>	65
--	-----------

<i>II.8 Genotipado del material murino</i>	66
--	-----------

<i>II.8.a EXTRACCIÓN DEL ADN</i>	66
----------------------------------	-----------

<i>II.8.b REACCIÓN DE LA POLIMERASA</i>	66
---	-----------

<i>II.8.c ELECTROFORESIS</i>	68
------------------------------	-----------

<i>II.9 Valoración de la integridad funcional del hipocampo</i>	68
---	-----------

RESULTADOS	69
-------------------	-----------

I) RESULTADOS: EL DESARROLLO DEL HIPOCAMPO HUMANO	71
--	-----------

<i>I. 1 Feto de Nueve Semanas de Gestación (PSG): estadio de cortical hem</i>	71
---	-----------

<i>I. 2 Feto de 10 semanas de gestación (10SG): Inicio de la formación del Hipocampo dorsal</i>	73
--	-----------

<i>I. 3 Feto de 12 semanas de gestación (12SG): Aparición de la placa Amónica (PA) y coexistencia de hipocampo dorsal e hipocampo ventral</i>	79
---	-----------

1.3.a HIPOCAMPO DORSAL.....	79
1.3.b HIPOCAMPO VENTRAL	83
1.3.c RECONSTRUCCIONES TRIDIMENSIONALES	85
 I. 4 Feto de 13 semanas: coexistencia de Hipocampo dorsal y ventral.	
Migración del giro dentado.....	86
1.4.a HIPOCAMPO DORSAL.....	86
1.4.b HIPOCAMPO VENTRAL	87
1.4.c RECONSTRUCCIONES TRIDIMENSIONALES	90
 I. 5. 14 Semanas: La profundización de la fisura del hipocampo	92
1.5.c RECONSTRUCCIONES TRIDIMENSIONALES	98
 I. 6. 16-17,5 semanas: atrofia del hipocampo dorsal	99
1.6.a HIPOCAMPO DORSAL	99
1.6.b HIPOCAMPO VENTRAL.....	101
 I.7. 21semanas: la historia del hipocampo ventral	109
1.7.a HIPOCAMPO DORSAL.....	109
1.7.b HIPOCAMPO VENTRA	110
 I. 8 El final del segundo trimestre. Perspectivas del tercer trimestre	113
 X. RECAPITULACIÓN DEL DESARROLLO DEL HIPOCAMPO HUMANO DURANTE EL PRIMER TRIMESTRE.....	120
 Xi. El desarrollo del giro dentado a finales del primer trimestre	120
 X ii. Esquemas resumen del desarrollo del hipocampo entre la novena y la décima tercera (9-13SG) semana del desarrollo intrauterino	124
 X iii. Resumen de los principales acontecimientos durante el desarrollo del hipocampo humano	127
<i>La migración del dentado</i>	<i>127</i>
<i>El desarrollo diferencial del hipocampo dorsal y ventral</i>	<i>132</i>
 II. RESULTADOS. EL HIPOCAMPO DEL RATÓN MUTANTE ADULTO p73 COMO MODELO DE HIPOCAMPO DE FISURA.....	137
 II. 1 Análisis morfológico del ratón p73-/-	137
1.1.a ESTRUCTURA ANATÓMICA	138

Asta de Amón
Giro dentado
Otras regiones

II.1.b. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LAS DIFERENTES POBLACIONES CELULARES EN EL HIPOCAMPO DEL RATÓN p73 -/-	143
---	------------

<u>II.1.b.1. Calretinina</u>	143
<i>Giro dentado</i>	
<i>Otras regiones</i>	

<u>II.1.b 2. Calbindina</u>	145
<i>Asta de Amón</i>	
<i>Giro dentado</i>	

<u>II.1.b 3. Parvalbúmina</u>	148
--------------------------------------	------------

<u>II.1.b 4. GFAP</u>	149
------------------------------	------------

<u>II.1.b 5. Reelin</u>	152
--------------------------------	------------

<u>II.1.b 6. Neurogénesis adulta</u>	155
---	------------

II.1.c. RECONSTRUCCIONES TRIDIMENSIONALES	155
--	------------

<u>II.1.c.1 Hipocampo p73+/+</u>	155
---	------------

Asta de Amón

Giro dentado

<u>II.1.c.2 Hipocampo p73-/-</u>	157
---	------------

II. 2. Breve introducción al análisis conductual del ratón adulto p73-/-	159
---	------------

DISCUSIÓN	161
------------------	------------

I. Aspectos generales del desarrollo del hipocampo humano	163
--	------------

II. Periodos principales en el desarrollo hipocampal	166
---	------------

III. El desarrollo de la fisura del hipocampo	168
--	------------

IV. El papel de las células de Cajal-Retzius en el desarrollo de la fisura del HP. El ratón p73-/-	169
---	------------

V. Otros factores involucrados en el desarrollo de la fisura del hipocampo. La vía SDF1-CxCR4.	171
---	------------

VI. La arquitectura del extremo uncal del hipocampo. Transición entre hipocampo y estructuras adyacentes	172
---	------------

VII. La migración del dentado en el desarrollo fetal humano.	174
---	------------

<i>VIII. La arquitectura del hipocampo en desarrollo. Hipocampo dorsal y ventral .</i>	175
--	-----

<i>IX. El cerebro humano como paradigma de desarrollo hipocampal</i>	179
--	-----

CONCLUSIONES	185
---------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA	187
---------------------	-----

Abreviaturas:

Hipocampo = HC

Hipocampo dorsal = HC d

Hipocampo ventral = HC v

Asta de Amón = CA

Giro dentado = GD

Cajal-Retzius = C-R (*)

Placa Amónica= PA (*)

Calretinina = CR

Calbindina = CB

ÍNDICE DE FIGURAS y TABLAS

Figuras:

Figura 1.1: el hipocampo humano y el caballito de mar (<i>Hippocampus hippocampus</i>). Adaptado de Iglesias JE. (The Global Scientist, 2013)	1
Figura 1.1.b: Sección del encéfalo de Henry Moleison mostrando la ausencia bilateral de HP.....	2
Figura 1.2: En esta figura se observa una visión medial del lóbulo límbico tal y como ha sido clásicamente definido Tomado de Testut (1922).....	3
Figura 2: Esquema de Lorente de Nó (1934) modificado por Stephan (1975) en el que observa la división de los distintos campos del asta de Amón y la definición clásica de CA4 / hilio hipocampal.	4
Figura 3: Cortes coronales de la región ventral de los hipocampos del macaco (arriba) y del hombre (abajo). (tomado de Rosene y van Hoesen, 1987)	6
Figura 4: Campo CA1 del macaco, homólogo al del humano. Bajo la fisura del hipocampo se encuentra una capa molecular, en la que se pueden diferenciar un <i>stratum lacunosum moleculare</i> (ml) con mayor cantidad de glía y un <i>stratum radiatum</i> (rd) con menor cantidad de glía. La capa piramidal (py) o capa principal está formada por células piramidales menos densamente empaquetadas que en el hipocampo murino. En el <i>stratum oriens</i> (or) se observan neuronas fusiformes señaladas con flechas. El <i>alveus</i> (al) es una capa de sustancia blanca que recubre al hipocampo. Las capas moleculares del asta de Amón, que contiene escasas neuronas dispersas (flecha), se encuentra adyacente y enfrentada a la correspondiente capa molecular del giro dentado. La fisura del hipocampo (hf) las separa. (Rosene y Van Hoesen, 1987)	7
Figura 5: fotografía de una impregnación de Golgi en un hipocampo murino adulto (cortesía de Gundela Meyer, Universidad de La Laguna).	9

Figura 6a: Corte coronal a través de la cabeza del hipocampo y el uncus del macaco. (Rosene y Van Hoesen, 1987)	10
Figura 6b: la complicada estructura de los extremos caudales del hipocampo en humanos. Tomado de Insausti et al, 2010.....	10
Figura 6c. Esquema de Santiago Ramón y Cajal (1911) en el que se muestra su teoría sobre el flujo de información a través del hipocampo (vía trisináptica). C: asta de Amón, D: girodentado; E: fimbria.	15
Figura 7a: Sección coronal de hipocampo teñido con el método de Timm. Tomado de Claiborne et al (1986)	17
Figura 7b.-El hipocampo intercambia información a través de la corteza entorrinal.	17
Figura 8: relaciones entre fimbria, fórnix y comisuras del hipocampo en una vista medial. Tomado de Rosene y van Hoesen (1977)	20
Figura 9: Cortes frontales teñidos para mielina del hipocampo y el Fórnix de un macaco rhesus. Rosene y van Hoesen (1977)	20
Figura 10: el triángulo cerebral (Testut, 1922)	21
Figura 11: se muestra un corte horizontal de ambos hemisferios cerebrales tras retirar el cuerpo calloso. (Testut, 1922).....	22
Figura 12: Suelo de los ventrículos visto desde de arriba, en una vista que permite observar el triángulo cerebral en su conjunto.. (Testut, 1922)	23
Figura 13. Vacuación del HC. Tomado de Tatu y Vuillier (2014).....	27

Figura 13b (izquierda) y 13 c (derecha). La frontera anatómica y molecular entre HCd e HC v. (Fanselow y Dong, 2010).....	29
Figura 14: El cortical hem murino (izquierda) y humano (derecha) teñido con p73 (Células de Cajal Retzius).....	40
Figura 15: El sistema del hem en una sucesión de esquemas. Meyer, G (2010).....	41
Fig16 (arriba) ,17 (abajo): Esquemas originales de Cajal de las neuronas de Cajal Retzius.....	42
Figura 18: células de Cajal Retzius en la zona marginal teñidas con calretinina (A) y Reelin (B). Tomado de Gil et al (2014).....	43
Figura 19: Coexpresión de p73 y Reelin en células de Cajal Retzius del cortical hem (A) y la corteza dorsomedial (B). Tomado de Meyer et al, 2002.....	43
Figura 20: Proceso de tallado del cerebro de un recién nacido a término.....	59
Figura 21. Concepto de solevación.....	64
Figura 22: Supervivencia de los ratones mutantes. Tomado de Medina Bolívar et al, 2014.....	65
Figura 23 (arriba): la placa pionera con Tbr1.....	72
Figura 24 (izquierda): la raíz de los plexos coroideos (d) en niveles posteriores, teñido con Calbindina. En este punto se produce la confluencia del hem dorsal y del hem ventral. Las estructuras adyacentes aún no han generado primordio hipocampal	72
Figura 25: El sistema del hem – plexos coroideos en niveles posteriores teñido con PCNA y Tbr.	73

Figura 26.1: Región dorsal y anterior (PCNA) mostrando el cortical hem dorsal y la raíz del plexo coroideo de los ventrículos laterales. Fig 26.2: Región posterior-unión de hem dorsal y ventral (PCNA). En la figura 26. X se muestra en detalle la expresión de calbindina en el hem dorsal, el plexo coroideo y la futura fimbria.....	74
Figura 27.1 : Detalle del hem ventral (PCNA)	76
Figura 27.2 : Detalle del antiguo hem dorsal en el que se observa expresión de CB en el plexo coroideo, pero no existe Placa Amónica dorsal CB+.	76
Figura 28 (PCNA): Unión de la placa hipocampal dorsal con imágenes en detalles de la placa hipocampal dorsal en niveles dorsales anteriores	77
Figura 29: el hipocampo dorsal de 12 SG	81
Figura 30 : microfotografías de la continuación del hipocampo dorsal con el septum y el hipocampo dorsal anterior con CB y CR.....	81
Figura 30, 2 : A la izquierda se observa la PA CB+, mientras que a la derecha se observa el agregado esferoidal CR+ que marca el primordio del GD.....	82
Figura 31: La continuidad de HC d e HC V de anterior a posterior con CB y CR.....	84
Figura 31.2 (sagital): Reconstrucción de la estructura tridimensional del hipocampo fetal a las 12 SG.....	85
Figura 32: El hipocampo dorsal.....	87
Figura 33: La unión entre hipocampo dorsal e hipocampo ventral (niveles posteriores). Con calretinina y calbindina.....	89
Figura 34: Esquema en el que se muestra la colocación de CB y CR en la unión de hipocampo ventral y dorsal y su distribución a lo largo de la fisura, en donde señalan la disposición de las neuronas de Cajal Retzius.. Gd: giro dentado. Ca: asta de Amón	90

Figura 35: reconstrucción tridimensional del hipocampo de 13 SG, en la que se pueden observar modelos del hipocampo fetal vistos desde la cara medial del hemisferio, a modo de cortes sagitales. También se muestra un esquema de colocación de CR y CB en el cuerpo calloso incipiente.....	91
Figura 36: coexpresión de p73 y Reelin en el acúmulo de Cajal Retzius de la fisura del hipocampo ventral	93
Fig 37: Detalle de la zona difusa de la fisura del Hc v mostrando los vasos fisurales y la acumulación de neuronas de C-R.....	93
Figura 38: Fisura del hipocampo ventral.....	94
Figura 39: tinción de Nissl en el hipocampo dorsal anterior y cercana a la unión entre hipocampo dorsal y ventral.....	95
Figura 40 (sagital): la unión entre hipocampo dorsal y ventral (cruz del hipocampo) con Nissl.....	96
Figura 41 .Las diferentes poblaciones celulares en torno a la fisura del hipocampo ventral.....	97
Figura 42 (visión sagital): reconstrucciones tridimensionales del hipocampo izquierdo de 15 SG.....	98
Figura 43. 43.A Scaffold secundario glial radial secundario del giro dentado ventral, asociado a la presencia de una fisura profunda con ancha zona marginal y anastomosis vasculares. 43.B Disposición de la glía radial en el hipocampo dorsal, donde se observa la ausencia de scaffold en la zona del giro dentado.....	100
Figura 44. El hipocampo dorsal anterior en una región ya ocupada por el cuerpo calloso (44.A) en la que se observan, en detalle, los restos de la segunda matriz del dentado con PCNA (44.B) y la ausencia de scaffold secundario glial radial (44.C)	100

Figura 45 (arriba). Microfotografías de la disposición de la calretinina en la unión entre HC d e HC v (45.A) y en la cabeza del hipocampo ventral (45.B). La flecha señala la superficie ventricular en 45.B y la fisura ventral en 45.A. *: notch; f-f: fimbria – fórnix; gdd: giro dentado dorsal; gdv: giro dentado ventral; CAd: asta de Amón dorsal; CAv: asta de amón ventral. 102

Figura 46. Calretinina en la unión entre hipocampo dorsal y ventral: se observa un giro dentado único con forma de salchicha y una fisura ventral profunda..... 102

Figura 47: células de cajal Retzius p73+ Reelin + en la fisura del hipocampo Ventral..... 103

Figura 48. 48.A: Anastomosis vasculares en la fisura del hipocampo ventral (vimentina). 48b: la matriz terciaria del giro dentado desprendiéndose de la secundaria en la cola del hipocampo ventral de 17,5 SG (PCNA)..... 104

Figura 49: La eminecia hipocampal a las 17,5SG con calretinina (A) y PCNA (B)... 105

Figura 50: PCNA en la eminencia hipocampal . A y B son tinciones de PCNA de hemisferios opuestos107

Figura 51. 51A y B: Reelin en la fisura del hipocampo ventral a nivel del uncus posterior. 51C y D: matriz secundaria del gd en un nivel posterior de la cabeza del hipocampo 108

Figura 52. Secciones sagitales de la región uncal con Nissl en un nivel anterior (52.B), intermedio (52.C) y posterior (52.A). En el extremo anterior se aprecia como la formación hipocampal, en la que ya se distingue subiculum, muestra morfología anular, resultado del corte. La zona hipocelular central corresponde a la confluencia de las zonas moleculares enfrentadas del subiculum y el presubiculum. Los números de la esquina inferior derecha indican el orden de anterior a posterior111

Figura 53: Secciones teñidas con Nissl del hipocampo dorsal (53.A), la cola del hipocampo ventral (53:B) y la unión entre hipocampo dorsal y ventral o cruz del hipocampo (53.C).....	112
Figura 54: La unión entre HC d e HC v a las 21 SG, con Nissl. Se observa la antigua cruz del hipocampo y la unión entre HC vy fasciola cinérea.....	114
Figura 55: La unión entre HC d e HC v a las 21 SG, con PCNA, se observa la persistencia de tercera matriz del dentado en el hilio dela cruz (55 A) y el extremo subcalloso del hilio, que se encuentra en la fasciola cinérea (55 B y C) y por lo tanto en el antiguo HC d.....	115
Figura 56: La unión entre induseum griseum y corteza cingular (56.A),la fasciola cinérea (56.C) y los niveles posteriores de la antigua cruz del HC (56.B y D), unión entre HC d e HC v a las 25 SG, con Nissl.....	116
Figura 57: Imagen de un atlas de referencia mostrando una estructura cruciforme en un hipocampo adulto, en la unión entre HC d e HC v	118
Figura 58: Imagen del polo uncal de un hipocampo de 36 SG, mostrando un gran giro dentado superficial que limita con la fisura uncal. : fisura del HC.....	119
Figura 59: HC d posterior con PCNA. C: eminencia ganglionar.....	121
Figura 60: la migración del giro dentado en el hipocampo dorsal coincide con la presencia de una fimbria y un plexo coroideo	122
Figura 61: La segunda matriz del dentado en el hipocampo dorsal y ventral con PCNA y prox 1.	122
Fig 62. Cronología del desarrollo del HC durante el primer trimestre	125

Figura 63. Esquema de la evolución del sistema hipocampo – fimbria – plexo coroideo desde un nivel anterior (63.A) hasta un nivel posterior (63.E) en el que hipocampo dorsal y ventral confluyen y el giro dentado es una estructura continua.....	126
Figura 64. La evolución de la migración del GD entre el segundo y el tercer trimestre, mostrando la primera matriz cuando esta se encuentra únicamente en el HC d a las 10 SG (64, sin número) y el desarrollo de la matriz secundaria a las 12 SG en el HCd...	130
Figura 65. La migración del Gd en la cabeza (65.A) y la cola (65.B) del HC v mostrando los múltiples <i>dentate notch</i> en la cabeza y las múltiples migraciones secundarias.....	131
Figura 66 La migración del Gd en la cabeza del HC v mostrando la matriz terciaria en el hilio del GD.....	131
Figura 67: Detalle de la segunda matriz del GD con PCNA	134
Figura 68: cabeza del hipocampo girificada de <i>Pan. Troglodytes</i> (brain museum org).....	134
Figura 69: El hipocampo del mutante. DG.	138
Figura 70. Lobulaciones del hipocampo p73 -/-. Se advierten los múltiples puntos de arranque de CA2	139
Figura 71: Ectopias del giro dentado, lobulaciones del hipocampo y giro dentado perforado por el subiculum. Se observa la elongación de CA3.....	140
Figura 72: Hipoplasia severa del hipocampo dorsal en un mutante de un mes, acompañada de una gravísima reducción de la corteza cerebral, hemorragias y cicatrices. En esta imagen se observa la ausencia de brazo infrapiramidal o medial del GD del HC d.....	142
Figura 73: subiculum perforando el giro dentado (detalle).....	142

Figura 74: hipocampo dorsal, calretinina,.....	143
Figura 75: detalle del núcleo cortical de la amígdala en el wt	144
Figura 76: Hipocampo dorsal y ventral con calretinina.....	145
Figura 77: Hipocampo dorsal con calbindina.....	146
Figura 78: detalle del hipocampo dorsal y las fibras musgosas aberrantes	147
Figura 79: Conexión aberrante entre hipocampo dorsal y ventral	147
Figura 80: Hipocampo ventral del mutante y el wt).....	148
Figura 81: Parvalbúmina en wt y ko en hipocampo dorsal.	149
Figura 82: Tinción con GFAP y detalle en nuestro mutante Cristiano Ronaldo (6 meses) y su hermano.....	151
Figura 83: detalle de GFAP en un lóbulo (patológico) del hipocampo	151
Figura 84: Resumen de las tinciones con calbindina calretinina y parvalbúmina (abajo) en el wt y el mutante.....	151
Figura 85: Hem del hipocampo en E14,5 teñido con anticuerpos contra Reelin.....	153
Figura 86: Inmunofluorescencia y microscopía confocal del wt (izq) y el ko (dcha) en el que se advierte la falta de progresión de Reelin en la zona marginal. En verde la expresión de Reelin, rojo para Tbr1	154
Figura 87: Ausencia de fisura (HF) en el hipocampo ko (dcha).....	154
Figura 88: PCNA en el hilio del dentado del wt y del ko)	155

Figura 89: transición entre hipocampo dorsal y ventral en el ko pt3 -/-	157
Figura 90: perfil del asta de Amón en el ratón p73 -/-) y el wt.....	158
Figura 91: La reconstrucción tridimensional del hipocampo wt y ko	158
Figura 92: Curvas de aprendizaje.....	160
Figura 93. Expresión génica en las diversas regiones del hipocampo, en el nivel de la cruz hipocampal (Fanselow y Dong, 2010).....	177
Figura 94. La cruz del hipocampo murino en una sección sagital (adaptado de Franklin y Paxinos, 2001).....	178
Figura 95. La conectividad de la corteza visual del macaco.....	180

Tablas

Tabla 1: eferencias del hipocampo.....	14
Tabla 2: Aferencias corticales del hipocampo	18
Tabla 3: aferencias no corticales del hipocampo	19
Tabla 4: anticuerpos utilizados en diversos estudios sobre la embriología del hipocampo.....	35
Tabla 5: Relación de muestras utilizadas. Además, como apoyo a nuestras conclusiones, se han utilizado los datos derivados del estudio del cerebro de un recién nacido a término.....	57

Tabla 6: relación de los principales anticuerpos empleados.....	61
Tabla 7. Evolución de las regiones hipocampales entre las 13 SG y las 25 SG.....	115
Tabla 8: Aprendizaje condicionado	159

INTRODUCCIÓN

I. ANATOMÍA DEL HIPOCAMPO DE LOS MAMÍFEROS

Las primeras menciones del hipocampo (HC) se deben a Arancio (1587), quien lo describió como una protrusión en el ventrículo lateral temporal parecida a un caballito del mar (*Hippocampus*, figura 1.1) y que estaría formada por una cabeza dotada de circunvoluciones, por un cuerpo y una cola (Rosene y van Hoesen 1987). Las primeras ilustraciones claras del HC se deben a Duveroni en 1729 (Jones et al., 2007) y su definición se ha prestado frecuentemente a confusión, dado que muchos autores han utilizado nombres diferentes para referirse a la misma estructura (Iniesta, 2014). Así, Garengot describe en 1742 el Cuerno de Amón (Garengot, 1742), aludiendo a la morfología espiral del HC en un corte coronal, que recuerda a la cornamenta del muflón, ungulado cuya cabeza encarnaba a la deidad egipcia Amón. La mayor parte de esta terminología ha sobrevivido hasta hoy, aunque quizás de forma confusa: la cabeza del caballito de mar de Arancio equivale al *pes hippocampi* de Diemerbroek (1672).

El HC es parte del arcuicórtex (Gastaut y Jammers, 1961), integrante del sistema límbico. En el humano hace prominencia en el asta inferior del ventrículo lateral, en el lóbulo temporal (figura 1.1 b). Esta prominencia se debe a un plegamiento del propio arcuicórtex sobre sí mismo en torno a un eje central, que es la fisura del HC.



Figura 1.1: el hipocampo humano y el caballito de mar (*Hippocampus hippocampus*). Adaptado de Iglesias JE. (The Global Scientist, 2013)

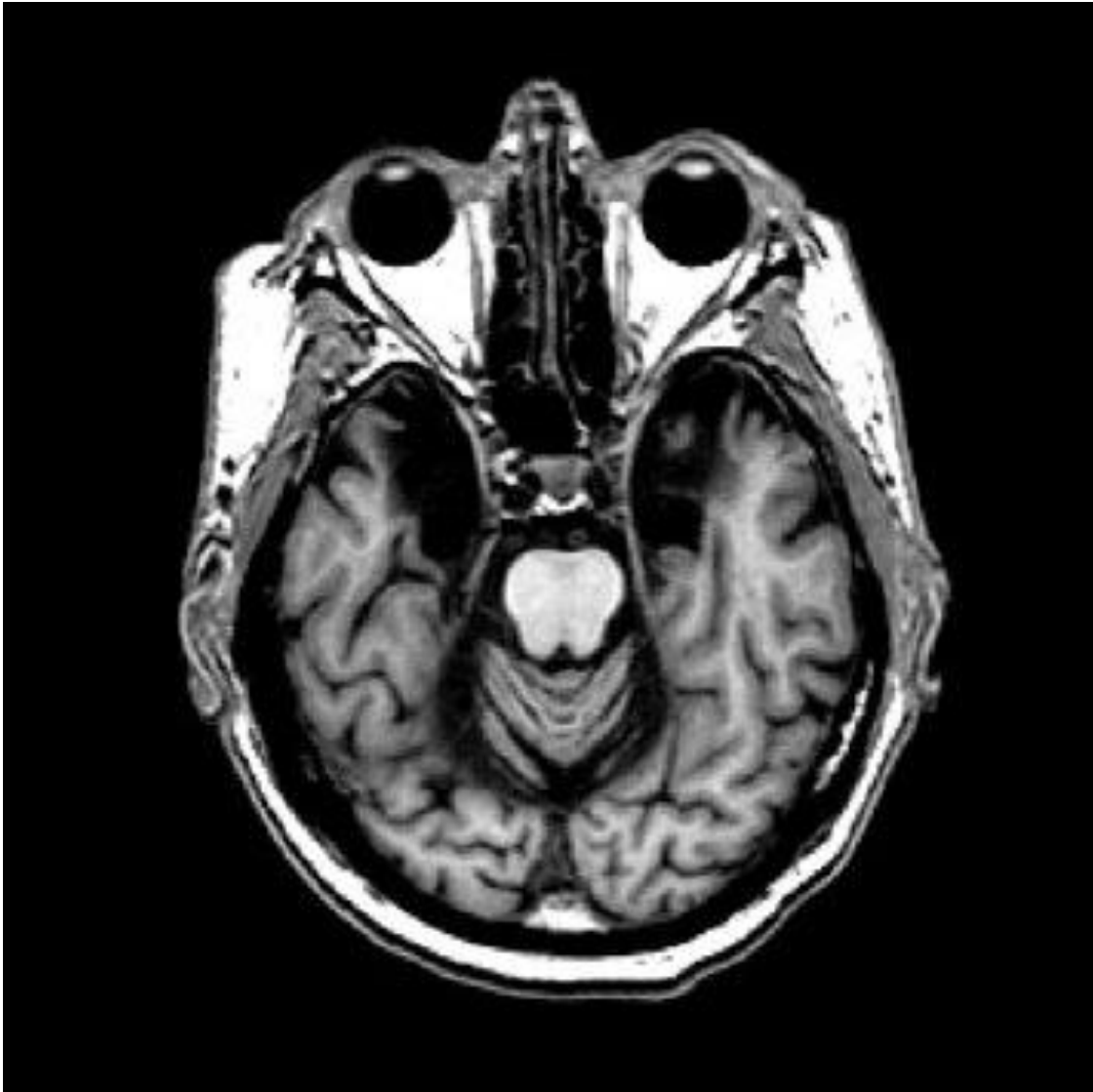


Figura 1.1 b: Sección del encéfalo de Henry Molaison mostrando la ausencia bilateral del HC

I. 1. Anatomía macroscópica

El HC se localiza en la profundidad de la región mesial del lóbulo temporal (Amat Muñoz y Smith-Agreda, 2007), encontrándose cubierto por la circunvolución parahipocampal (ver figuras 1.2 y 2). En cortes coronales muestra aspecto de dos cintas enrolladas una sobre otra, que se corresponden con el asta de Amón y el giro dentado (GD), respectivamente. El HC está revestido por una capa de sustancia blanca, el *alveus*.

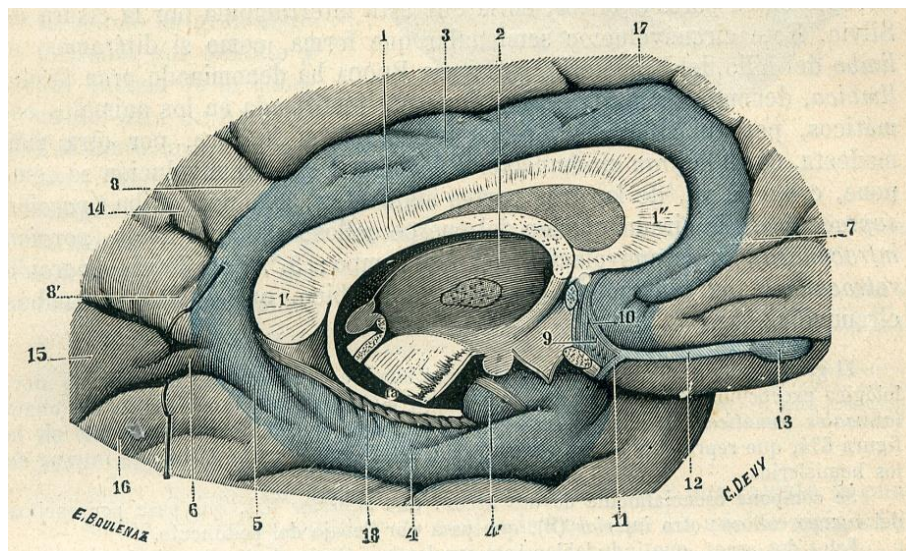


Figura 1.2: En esta figura se observa una visión medial del lóbulo límbico tal y como ha sido clásicamente definido, sombreado en azul. El cuerpo calloso (1), con su rodilla anetrio (1') y su rodete posterior (1'') limita con el lóbulo límbico. El lóbulo límbico se encuentra separado de los lóbulos frontales y parietales por pliegues relativamente profundos (7, 8, 8'). En esta vista se identifican claramente la circunvolución del hipocampo (4) y el uncus (4'). Tomado de Testut (1922).

El HC está formado por el conjunto de tres estructuras arquicorticales (es decir, una corteza organizada en tres capas): el *subiculum*, el asta de Amón y el GD o fascia dentada (*fascia dentata*). Se habla de un HC propiamente dicho (*hippocampus proper*) cuando se hace referencia a los cuatro campos del asta de Amón en los que se identifica más claramente una organización en cuatro regiones que Lorente de Nó (1934) describió como campos CA1, CA2, CA3 y CA4 (figura 2) (ver también Larriva –Sahd, 2002). El concepto de formación hipocampal es más amplio, incluyendo el complejo subicular, el asta de Amón y la *fascia dentata* e incluso la corteza entorrinal. Algunos autores (Amaral, 1978) identifican el área CA4 con el hilio del HC, que es la región donde el asta de Amón se introduce en el GD sin que exista fisura separándolos. De

hecho, según Amaral (Amaral y Dent, 1981), las células del área CA4 (llamadas por muchos autores recientes “células musgosas” (*mossy cells*) están más estrechamente relacionadas con el GD que con el asta de Amón, y deben considerarse como pertenecientes a la zona polimorfa de esta *area dentata*, como propuso inicialmente Blackstad (1956). Esto está aún por aclarar, y en la nomenclatura actual se encuentra muchas veces el término CA3 cuando se habla del hilio, y el campo CA4 de Lorente de Nó (Tatu y Vuillier, 2014; Schultz y Engelhardt, 2014; Insausti y Amaral, 2012).

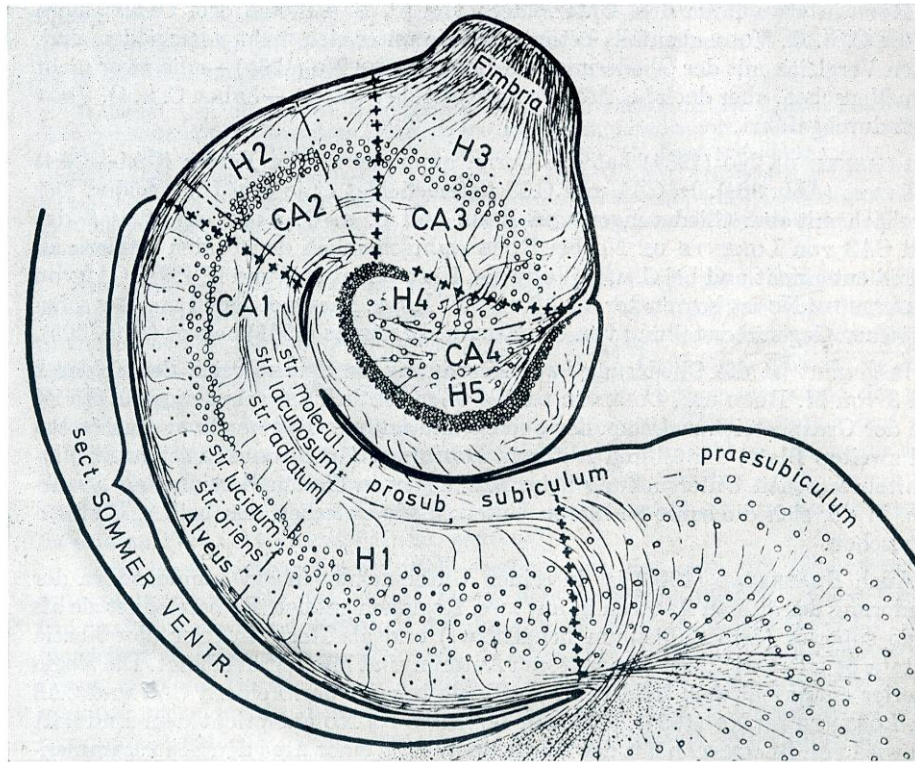


Figura 2: Esquema de Lorente de Nó (1934) modificado por Stephan (1975) en el que observa la división de los distintos campos del asta de Amón y la definición clásica de CA4 / hilio hipocampal. En cambio, los autores señalan como *stratum lucidum* a una banda celular inmediatamente adyacente a la capa de células principales: esto corresponde con un concepto antiguo (Ganser, 1879; 1882). Hoy en día el *stratum lucidum* se define exclusivamente en CA3 y su presencia se debe a la terminación de las fibras musgosas

Aunque estas consideraciones son válidas, de una forma global, para el HC de los mamíferos, es necesario tener en cuenta que el HC del roedor –en el que se han realizado multitud de estudios experimentales- difiere ampliamente del humano. En el roedor se extiende en su mayor parte dorsalmente al tálamo, y su punta anterior alcanza el agujero de Monro justo por detrás del área septal. La parte posterior del HC se extiende ventralmente hasta alcanzar la región situada caudal y medialmente a la amígdala.

En el humano y en los primates en general la formación hipocampal entera está situada en el lóbulo temporal medial y su parte más rostral (cabeza, figura 3) empieza en la región inmediatamente posterior a la amígdala.

El GD es la parte más medial del HC y se caracteriza por una capa de células principales que son los granos (células pequeñas muy compactas); adquiere forma de cabeza de flecha o de C en secciones coronales y en ella se puede reconocer un brazo infrapiramidal (en contacto con la piamadre) y un brazo suprapiramidal (que limita con la fisura del HC). Los granos del GD son el origen de las fibras musgosas que proyectan a CA3. El GD está separado de los campos CA1 y CA2 del asta de Amón por la fisura del HC, en su mayor parte obliterated. El GD no está en contacto directamente con el ventrículo, sino que su superficie está recubierta de piamadre, tanto en su porción “libre” como en aquella que acompaña a la fisura del HC aunque en las regiones más profundas, obliterated, de la fisura, la piamadre es prácticamente indetectable, en contraste con su arranque, claramente señalado por un ramillete de vasos. Las neuronas granulares poseen un denso árbol apical de dendritas que se ramifican en la capa molecular. Por debajo de los granos existe una tercera capa que en su mayor parte consiste, en los roedores, en una banda de células polimorfas dispersas, ahora identificada como el hilio.

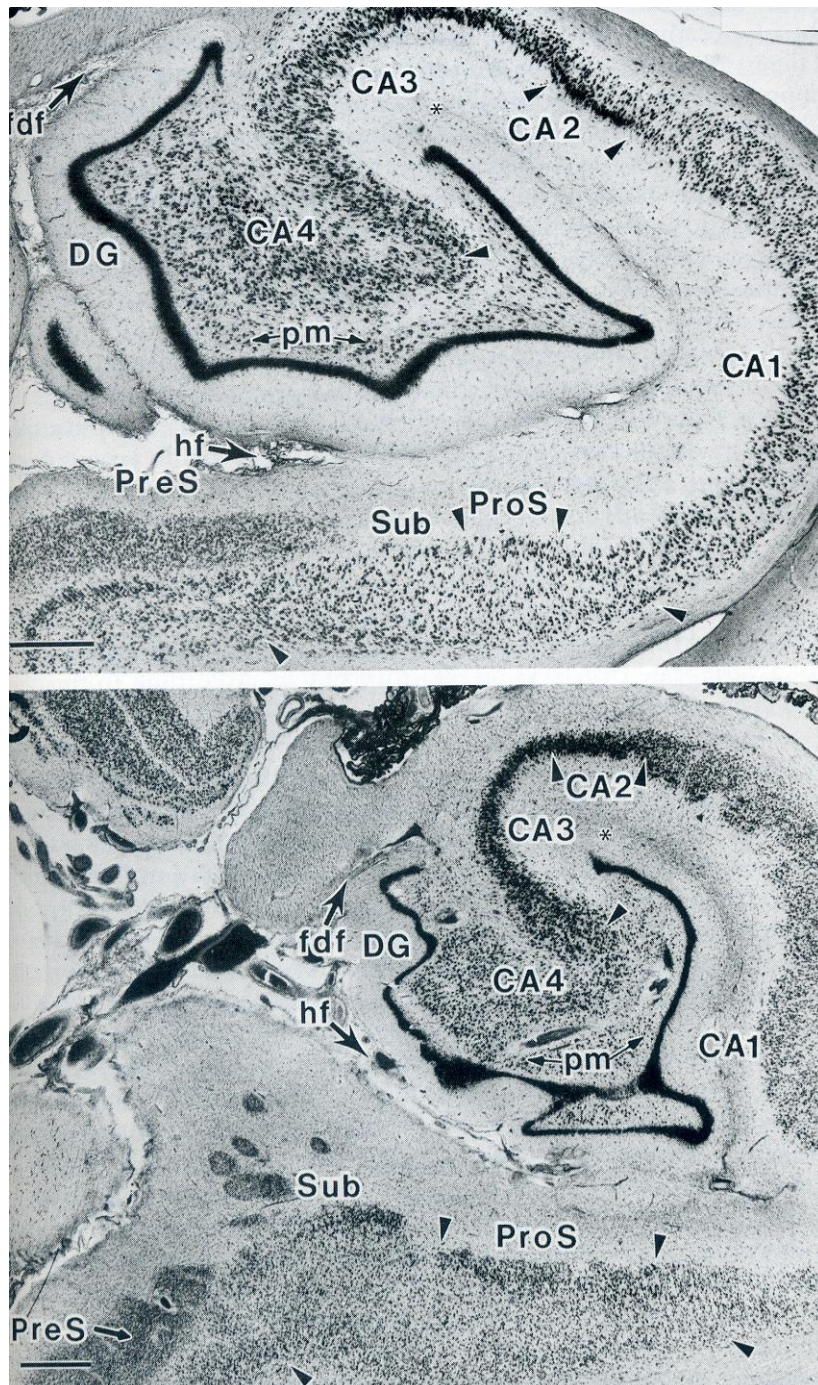


Figura 3: Cortes coronales de la región ventral de los hipocampos del macaco (arriba) y del hombre (abajo). Se muestran los campos amónicos, considerando el hilio del hipocampo como CA4. Sub: *subiculum*, ProS: *prosubiculum*, PreS: *presubiculum*, hf: fisura del hipocampo; fdf: fimbria. (tomado de Rosene y van Hoesen, 1987)

I. 2. *Estructura histológica*

Todas las áreas del HC comparten como característica una organización cortical simplificada en tres capas (Ramón y Cajal, 1911; Lammers, 1972; Stephan, 1975; figuras 4 y 5).

1. Una capa superficial o molecular con pocos cuerpos neuronales pero conteniendo glía y neuropilo. Stephan (1975) subdivide, en el asta de Amón, esta capa en 2: *stratum lacunosum* y *stratum moleculare*; otros juntan ambas capas en una (*stratum lacunosum-moleculare*).
2. Una capa intermedia, celular, donde aparece compactado un claro grupo de células principales, bien sean células granulares (en GD) o piramidales (asta de Amón, *subiculum*).
3. Una capa profunda polimorfa formada por neuronas polimorfas, no piramidales y neuropilo (*stratum oriens* con el *alveus*; hilio del GD).

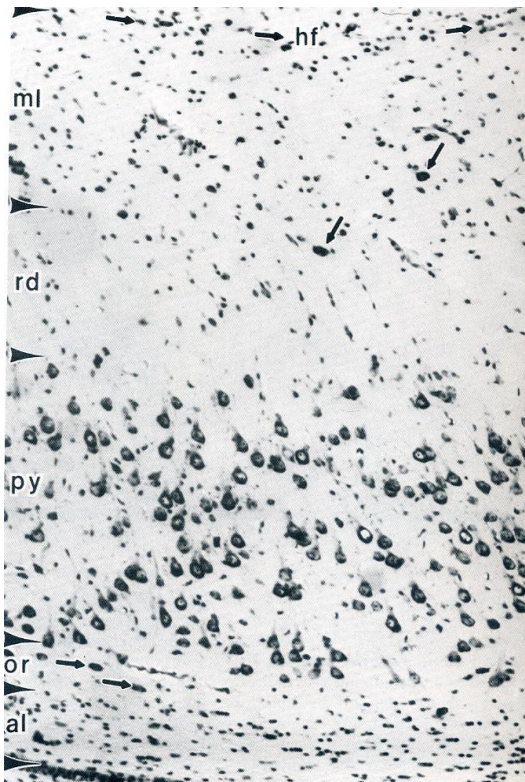


Figura 4: Campo CA1 del macaco, homólogo al del humano. Bajo la fisura del hipocampo se encuentra una capa molecular, en la que se pueden diferenciar un *stratum lacunosum moleculare* (ml) con mayor cantidad de glía y un *stratum radiatum* (rd) con menor cantidad de glía. La capa piramidal (py) o capa principal está formada por células piramidales menos densamente empaquetadas que en el hipocampo murino. En el *stratum oriens* (or) se observan neuronas fusiformes señaladas con flechas. El *alveus* (al) es una capa de sustancia blanca que recubre al hipocampo. Las capas moleculares del asta de Amón, que contiene escasas neuronas dispersas (flecha), se encuentra adyacente y enfrentada a la correspondiente capa molecular del giro dentado. La fisura del hipocampo (hf) las separa. (Rosene y Van Hoesen, 1987)

Centrándonos en el asta de Amón, esta subdivisión en capas es válida para las regiones CA1-CA3, no para la CA4, en la que no hay capas claramente delimitadas; en esta zona existen, sin embargo, células piramidales modificadas que se encuentran en continuación con las de CA3. Hay una transición mal definida entre hilio del GD y asta de Amón, problema aún hoy no resuelto de forma satisfactoria. En resumen Stephan (1975) proponen clasificar las estructuras principales del HC de la siguiente forma:

Subiculum:

Stratum moleculare

Stratum pyramidale

Stratum multiforme

Cornu Ammonis:

Stratum moleculare (1), con

Substratum eumoleculare (1a)

 Lacunosum (1b)

 Radiatum (1)

 Lucidum (1) (sólo en CA3)

Stratum pyramidale (2)

Stratum oriens (plexiforme/ polimorfa/ multiforme) (3)

Fascia dentata :

Stratum moleculare (a)

Stratum granulare (b)

Hilus fasciae dentatae (c)

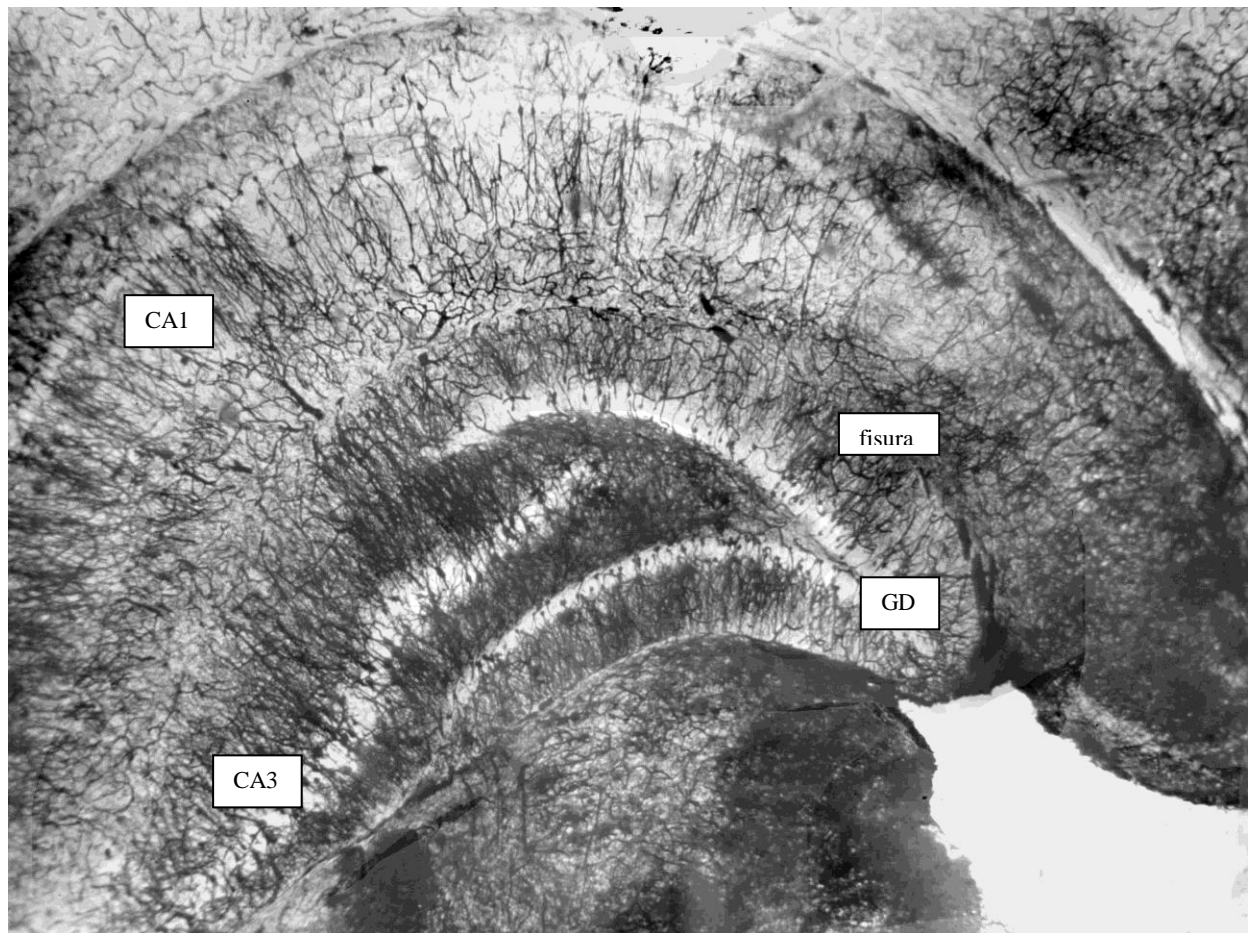


Figura 5: fotografía de una impregnación de Golgi en un hipocampo murino adulto (cortesía de Gundela Meyer, Universidad de La Laguna) GD=giro dentado; CA= campos amónicos.

El campo CA3 está formado por una capa de neuronas piramidales que se caracterizan por unas excrecencias dendríticas en las que hacen sinapsis las fibras musgosas formando el *stratum lucidum*. Sus dendritas apicales se extienden superficialmente hacia la fisura. Las células de CA3 emiten las colaterales de Schaffer que terminan en CA1. Es en el campo CA1 donde se reconoce mejor la organización en tres capas: el *stratum oriens*, el *stratum pyramidale* y el *stratum lacunosum moleculare* (donde se ramifican las dendritas apicales y que, en el desarrollo, contiene las neuronas de Cajal Retzius). El área CA1 se identifica claramente en los roedores, constituyendo una zona de neuronas piramidales densamente agrupadas. El uncus es el extremo anterior, puede considerarse equivalente a la cabeza del HC, se continúa con el cuerpo del HC y se dirige caudal y dorsalmente hasta acabar (cola) debajo del esplenio del cuerpo calloso mediante la *fasciola cinerea*. La arquitectura del HC en el humano varía según nos encontremos en cabeza, cuerpo o cola. En la literatura actual las explicaciones sobre la

cabeza del HC son poco satisfactorias, dada la complejidad de esta estructura (figuras 6a y 6b).



Figura 6a: Corte coronal a través de la cabeza del hipocampo y el uncus del macaco. Para S: *parasubiculum*; PreS: *presubiculum*; Sub: *subiculum*; ProS: *prosubiculum*; hf: fisura del hipocampo; rd: *stratum radiatum*; py: estrato piramidal del asta de Amón; pm: capa plexiforme. gc: estrato de los granos del dentado; DG: giro dentado; CA: campos amónicos (Rosene y Van Hoesen, 1987)

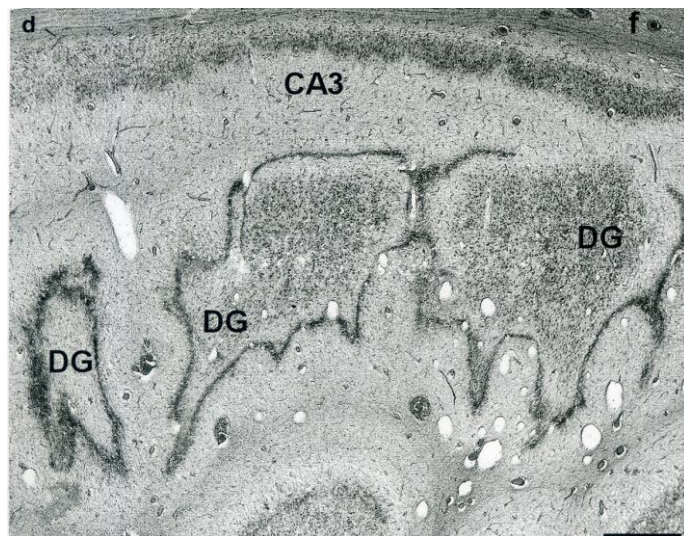


Figura 6b: la complicada estructura de los extremos caudales del hipocampo en humanos. DG: giro dentado.
Tomado de Insausti et al, 2010

El área CA3 se continúa con el área CA1 a través de una región que muchos consideran una simple región de transición, donde se conserva la arquitectura previamente descrita, pero no recibe fibras musgosas y, por lo tanto, carece de *stratum lucidum*. Lorente de Nó denominó a esta región campo CA2. Estudios recientes han demostrado que CA2 tiene entidad propia y establece conexiones funcionalmente importantes y diferentes a las de CA3 y CA1 (Chevalleyre y Siegelbaum, 2010; Ding et al., 2010; Jones y McHugh, 2011).

El campo CA1 recibe las aferencias de las colaterales de Schaffer y el punto donde estas terminan fue identificado por Lorente de Nó como el final del HC propiamente dicho (asta de Amón, *hippocampus proper*) y el inicio del *prosubiculum*. El *prosubiculum* es frecuentemente ignorado en las descripciones del HC, y muchos autores lo consideran como una zona de transición poco delimitable entre el asta de Amón y el *subiculum*. En el presente trabajo nos limitaremos, en la medida de lo posible, a exponer nuestros datos sobre el el asta de Amón y el GD, dejando al margen al *subiculum* o al conjunto de estructuras allocorticales que forman el complejo subicular (*prosubiculum*, *subiculum*, *presubiculum*, *postsubiculum* y *parasubiculum*). En conjunto, en roedores, el *subiculum* es una zona más ancha y más compleja aunque sigue respetando la disposición trilaminar propia del allocórtex (Lorente de Nó, 1934; Amaral, 1978; Ramón y Cajal, 1911). De todas estas subregiones, el *subiculum* y el *prosubiculum* constituyen el origen de algunas de las eferencias más importantes del HC (Meibach y Siegel, 1977; Rosene y van Hoesen, 1977; Swanson y Cowan, 1977). El *prosubiculum* se diferencia del campo CA1 del asta de Amón y del *subiculum* por la presencia de células de menor tamaño densamente empaquetadas en contraste con las del *subiculum*, que expresan acetilcolinesterasa (Ding, 2013; Rosene y van Hoesen, 1987) intensamente, mientras que las del *subiculum* propiamente dicho muestra una mayor expresión de parvalbúmina y neurofilamento SMI 32 (Ding y van Hoesen, 2010; Fujise et al, 1995). En comparación con CA1, el *prosubiculum* presenta neuronas piramidales de menor tamaño y carece de *stratum radiatum*, que está más claramente desarrollado en CA1. El asta de Amón muestra una expresión nula o débil de neurotensina y tirosina hidroxilasa, y se puede delimitar desde el punto de vista molecular mediante la detección de syntaxina 1 A, sic30a3 (Ding, 2013). La principal característica del *subiculum* es la presencia de neuronas piramidales gigantes, mucho mayores que las del asta de Amón, que conforman una capa principal ancha y relativamente densa, características que

aumentan conforme el *subiculum* se “aleja” del asta de Amón (Rosene y van Hoesen, 1987). Además, en el *subiculum* no se identifica *stratum oriens* sino una capa llamada multiforme o plexiforme con una región profunda densa de neuronas piramidales pequeñas y otra más superficial formada por neuronas fusiformes (Rosene y van Hoesen, 1987). Además, en la zona más superficial no se expresa receptor 2^a de hidroxitriptamina (Ding, 2013).

El uncus es el extremo anterior del HC, y equivale a la cabeza del HC que se continúa con el cuerpo. Este se dirige caudal y dorsalmente y acaba como cola debajo del esplenio del cuerpo calloso mediante la *fasciola cinerea*. La arquitectura del HC humano varía según nos encontremos en cabeza, cuerpo o cola. La literatura reciente (Ding, 2013; Ding y Van Hoesen, 2015) está abarcando también la cabeza del HC humano, que durante mucho tiempo había permanecido como la región menos conocida, dada su complejidad estructural que la diferencia de la de los roedores. En la zona uncal el *subiculum* y CA1 muestran unas características algo diferentes a las del cuerpo y cola (Rosene y van Hoesen, 1977; Barbas y Blatt, 1995); se denominan CA1 modificado y *subiculum* uncal. En las regiones uncales se identifica una mayor densidad neuronal y relaciones algo diferentes entre las mismas, en el contexto de una arquitectura compleja y menos explorada. Las neuronas de CA1 y *subiculum* uncales son significativamente más pequeñas que las de sus pares en el resto del HC. Dorsomedialmente al CA1 uncal se identifica un área donde estas características se exageran y que se denomina área de transición hipocampo-amigdalal (HATA; Rosene y van Hoesen 1987).

I. 3. Conexiones

I. 3. a. EFERENCIAS.

El HC conecta con gran variedad de áreas corticales y subcorticales, tanto a través del fórnix como a través de conexiones no forniciales (Andersen et al., 1971; Andersen, 1975). En general, el asta de Amón proyecta de forma predominante a los núcleos septales, mientras que el *subiculum* y sus zonas adyacentes llevan las principales eferencias al diencefalo.

Las fibras que del HC se extienden a los tubérculos mamilares siguiendo el fórnix proceden fundamentalmente del *subiculum* pero también de zonas supracallosas que conectan con la corteza cingular y la zona de transición con la amígdala. El núcleo anterior del tálamo recibe proyecciones de la zona más profunda de la capa piramidal del *subiculum* a través del fórnix; además, el tálamo recibe conexiones del HC no forniciales que alcanzan el núcleo pulvinar desde el *subiculum* (Aggleton et al, 1986). El núcleo *accumbens* parece recibir conexiones de la porción uncal del *prosubiculum* (Ding, 2013).

Los núcleos del prosencéfalo basal, las áreas más ventrales del *septum* y la banda diagonal de Broca reciben proyecciones que proceden de las capas piramidales de todos los campos amónicos (Powell y Hines, 1975; Krayniak et al, 1979), pero también de neuronas del *stratum oriens* y del *stratum radiatum* (Alonso y Köhler, 1982) así como de neuronas del hilio del GD (Chronister y De France, 1979). El *subiculum* y las capas piramidales de CA1 anterior proyectan extensamente al complejo amigdaloides (Ottersen, 1982; Rosene y Van Hoesen, 1987; Saunders et al, 1988; Saunders y Rosene, 1988). El *subiculum* conecta intensamente con el área 29 del córtex retrosplenial (Aggleton et al, 2005; Ding, 2013)

El HC proyecta también hacia áreas corticales. Es de interés señalar que estas proyecciones parecen más amplias y variadas en primates que en otros mamíferos (Rosene y van Hoesen, 1987). Se han descrito conexiones al córtex entorrinal y perirrinal desde CA3 (Swanson y Cowan, 1975 a y b), CA1 (Swanson et al, 1978) y *subiculum*, pero no desde el *prosubiculum* (Saunders y Rosene, 1988; Ding, 2013), así como conexiones entre *subiculum* y córtex frontal, que también recibe aferencias de las mismas neuronas piramidales que de CA1 proyectan al cortex entorrinal (Swanson, 1981). Existen también proyecciones desde el *subiculum* hasta el córtex prefrontal dorsolateral (Goldman–Rakic et al, 1984).

El área CA1 proyecta al córtex parahipocampal posterior y temporal ventral (van Hoesen et al, 1979; Kosell et al, 1983; Ichinobe y Rockland, 2005). Estas conexiones se resumen en la Tabla 1.

<i>Tipo</i>	<i>Origen</i>	<i>Destino</i>
Subcorticales	Subiculum	Tubérculos mamilares
		Núcleo Anterior Talámico
		Núcleo pulvinar
		Amígdala (núcleos basales)
	CA1	Prosencéfalo basal
		Septum
		Banda Diagonal
		Amígdala (basal)
	CA2 CA3	Prosencéfalo Basal
		Septum
		Banda Diagonal
		Amígdala (basal)
Corticales	Subiculum	Córtex perirrinal (no <i>prosubiculum</i>)
		Córtex entorrinal (no <i>prosubiculum</i>)
		Córtex frontal
		Amígdala (cortical)
		Córtex retrosplenial
		Córtex prefrontal dorsolateral
	CA1	Amígdala (cortical)
		Córtex parahipocampal posterior
		Córtex temporal ventral
		Córtex perirrinal y Entorrinal
		Córtex frontal
	CA3	Córtex Entorrinal
		Córtex perirrinal

Tabla 1: eferencias del hipocampo

I. 3. b. AFERENCIAS

1.3.b.1. Aferencias corticales

La aferencia principal al HC procede de la corteza entorrinal, que a su vez actúa como estación intermedia entre las áreas neocorticales y el HC. La corteza entorrinal establece conexiones bidireccionales con una gran variedad de áreas corticales multisensoriales y de asociación (Insausti y Amaral, 2008; Mohedano-Moriano et al., 2008). En general las capas superficiales de la corteza entorrinal proyectan al HC, mientras que el HC proyecta a las capas profundas de la corteza entorrinal, las cuales a su vez proyectan a sus capas superficiales (Kloosterman et al., 2003; Kloosterman et al., 2004), cerrando así el circuito. CA1 recibe información entorrinal a través de dos vías, una directa y otra indirecta (Witter y Amaral, 2004). La vía directa sale de la capa III y forma sinapsis con las pirámides e interneuronas de CA1. La vía indirecta es a través de la vía perforante, un conjunto de aferencias conservado evolutivamente y compartido por todos los mamíferos estudiados hasta el momento (Hojrth-Simonsen y Jeune, 1972; Manns y Eichenbaum, 2006). La vía perforante transmite la información de la corteza entorrinal al HC a través de la vía trisináptica clásica, ya descrita por Ramón y Cajal (1911).

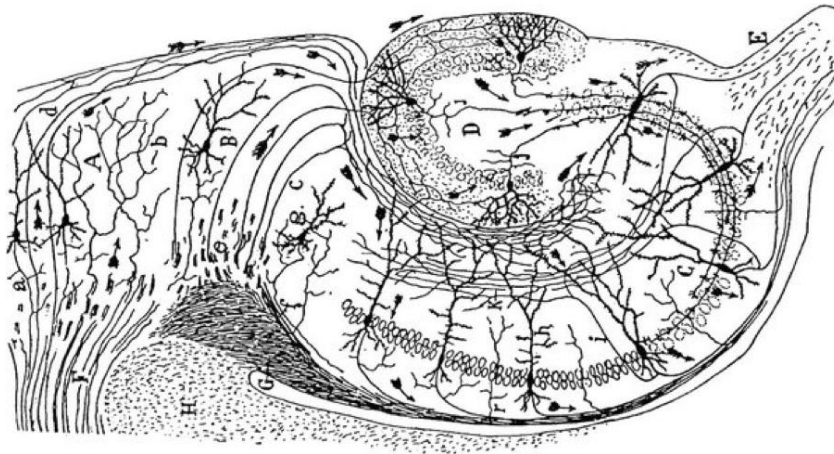


Figura 6c. Esquema de Santiago Ramón y Cajal (1911) en el que se muestra su teoría sobre el flujo de información a través del hipocampo (vía trisináptica). C: asta de Amón, D: giro dentado; E: fimbria.

El circuito trisináptico se origina de las capas II y III de la corteza entorrinal, de una forma topográfica muy precisa, y establece sinapsis con las neuronas granulares del GD. De las neuronas granulares parten las fibras musgosas (figura 7 a) que establecen sinapsis con las excrescencias peculiares de las neuronas piramidales de CA3. CA3 a su vez conecta con las neuronas piramidales de CA1 a través de las colaterales de Schaffer. Por último, las células piramidales de CA1 envían una proyección hacia las células piramidales del *subiculum* y el *prosubiculum* (Ramón y Cajal, 1911; Lorente de No, 1934; Blackstad, 1956; Blackstad, 1958; Amaral 1978; Bayer, 1985 Amaral y Witter, 1989 Witter et al, 1989). Todas estas conexiones son excitatorias, y durante muchos años se pensaba que la vía perforante y el circuito trisináptico constituían la vía principal de transmisión de información en el HC. Sin embargo, se comprobó que la corteza entorrinal también proyecta directamente a cada uno de los subcampos del asta de Amón, incluyendo a CA2 (Steward 1976; Witter et al., 1988; Brun et al., 2002; Ding et al., 2010). Estas conexiones se resumen en la Tabla 2. El sistema entorrinal-hipocampal (Amaral et al., 2014) contiene un conjunto de representaciones de la situación del individuo en el espacio (figura 7). En el HC, determinadas células (*place cells*) se activan en posiciones espaciales muy específicas dentro del medio ambiente (O'Keefe y Dostrovsky, 1971). A su vez, células en la capa II de la parte medial de la corteza entorrinal contienen las llamadas *grid cells* que responden a determinados cambios del individuo o animal experimental en el espacio (Hafting et al., 2005). *Grid cells* están mezcladas con células que responden a cambios en la dirección de la cabeza (*head direction cells*, Sargolini et al., 2006), y células que se activan cuando el animal se mueve a lo largo de los límites de un territorio determinado (*border cells*, Savelli et al., 2008). *Grid cells*, *border cells* y *head direction cells* se encuentran tanto en la corteza entorrinal medial como en *presubiculum* y *parasubiculum* (Boccaro et al., 2010). La representación en el espacio parece ser una función fundamental del sistema entorrinal-hipocampal (Moser y Moser, 2013); la cuestión es como compaginar la función espacial con la otra gran función conocida del HC, la adquisición de la memoria, como es bien conocido y se comentará reiteradamente en este trabajo.



Figura 7a: Sección coronal de hipocampo teñido con el método de Timm. Las fibras musgosas se tiñen de negro y se extienden desde el hilio (H) al campo CA3, cuya capa piramidal se marca con flechas blancas. GL: capa granular. ML: capa molecular. Tomado de Claiborne et al (1986)

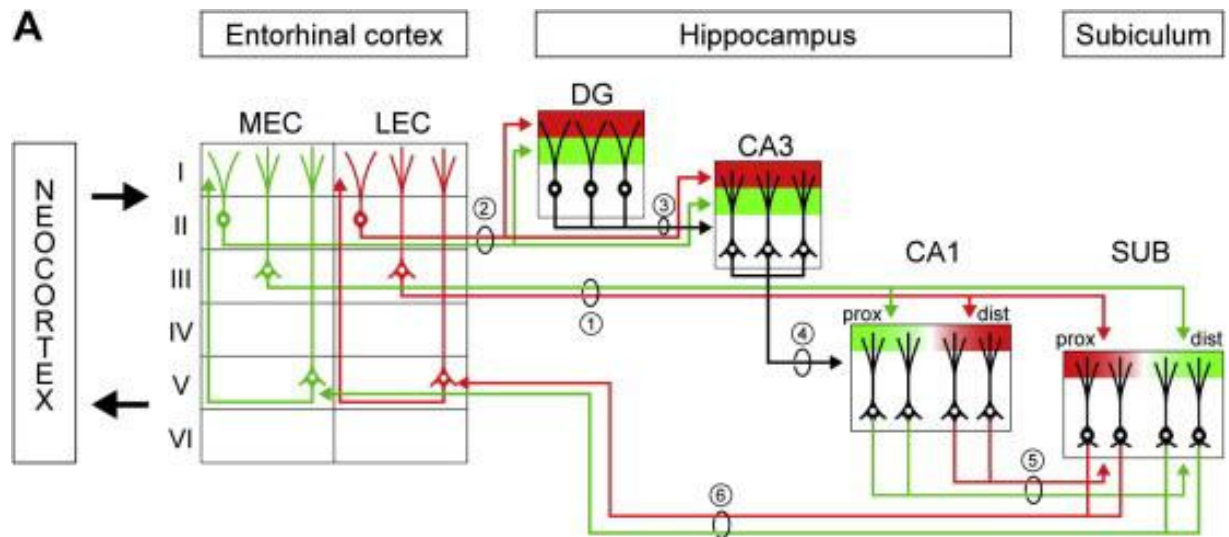


Figura 7b.-El hipocampo intercambia información a través de la corteza entorrinal en la que se puede distinguir una región medial y una región lateral. De la corteza entorrinal a CA1 existen conexiones directas e indirectas: La vía directa (1) parte de la capa III de la corteza entorrinal y se dirige al campo CA1. La región entorrinal medial proyecta a la región proximal de CA1, y la lateral, a la distal de CA 1. La vía indirecta (2) parte de la capa II y se dirige a GD y CA3. Esta información conjunta procedente de CA3 y GD se vehiculiza a través de las fibras musgosas (3) y las colaterales de Schaffer. La información integrada de CA1 alcanza la corteza entorrinal fundamentalmente a través del *subiculum*, de tal manera que la información de CA1 proximal alcanza la corteza entorrinal medial a través del *subiculum* distal y la información de CA1 distal alcanza la corteza entorrinal lateral a través del *subiculum* proximal (5,6). Tomado de Igarashi et al, 2014)

	Córtex entorrinal (van Hoesen y Pandya 1975, a ,b; Van Hoesen	Capa molecular del Giro dentado
		Capa molecular de todos los

Vía Perforante	et al, 1975; Stanfield y Cowan, 1979)	campos amónicos
	Córtex perirrinal	Capa molecular del <i>subiculum</i>
Otras aferencias	Núcleo cortical de la amígdala	Capa piramidal de CA3 / CA2
	Giro parahipocampal	<i>Subiculum</i> (principal)
	Córtex Frontal y prefrontal (Leichnetz, 1975)	
	Córtex temporal	
	Córtex temporal (Schwerdtfeger, 1979)	CA1 (Rockland y van Hoesen, 1999)
	Córtex de asociación temporal	

Tabla 2: Aferencias corticales del hipocampo

1. 3. b. 2. Aferencias no corticales

Existen múltiples aferencias subcorticales al HC. El núcleo supramamilar del hipotálamo conecta con la capa granular del GD y con la zona de la capa molecular inmediatamente adyacente. Además, en los primates se observa una amplia proyección hacia CA2, concretamente hacia la capa piramidal y el *stratum radiatum*, lo que supone una de las conexiones más específicas que existen (Haglund et al, 1984; Veasey et al, 1982, a y b).

La amígdala es una estructura parcialmente cortical que conecta ampliamente con el HC desde el núcleo basal lateral (Amaral y Cowan, 1980), el núcleo basal medial, el núcleo cortical y los núcleos basales accesorios (Saunders et al, 1988; Saunders y Rosene, 1988). Estas proyecciones se dirigen fundamentalmente hacia las capas moleculares del *subiculum* y, muy especialmente, del *parasubiculum* (Krettek y Price, 1977; Saunders et al, 1988; Saunders y Rosene, 1988; Pikkarainen et al, 1999; Ding et al, 2000). Las proyecciones desde el núcleo cortical y desde el núcleo basal accesorio alcanzan las pirámides de CA3 y CA2 (Saunders et al, 1988; Saunders y Rosene, 1988). Otra aferencia subcortical importante procede de los núcleos del prosencéfalo basal. Esta inervación no es exclusivamente colinérgica a pesar de su origen (Amaral y Kurz, 1985 a y b). Las conexiones entre el HC y los núcleos septales y la banda diagonal de Broca son de carácter masivo y se dirigen al hilio del GD, al *stratum oriens* de CA3 y CA2 y la capa molecular y piramidal del *subiculum*. Existe un segundo grupo de aferencias de menor intensidad que alcanza al GD y el asta de Amón en toda su

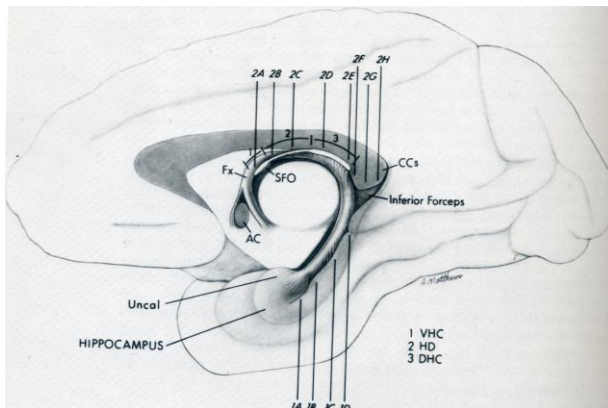
extensión a la altura de la capa molecular, así como al *stratum radiatum* de CA3 y el *oriens* del CA1. Estas conexiones muestran especialización topográficas, siendo mucho más intensas a nivel uncal. Además, las aferencias que proceden de la parte vertical de la banda diagonal se dirigen al GD y las que proceden del resto de las áreas septales y del prosencéfalo basal parecen seguir un patrón de distribución de lateral a medial en el que los tractos más laterales acaban en el polo subicular de CA1 (van Hoesen y Rosene, 1979; Amaral y Kurz, 1985 a y b; Rosene y van Hoesen, 1987; Ullmann et al, 2006). En los años ochenta del siglo pasado se realizaron detallados estudios que permitieron identificar gran variedad de aferencias al HC procedentes del tronco encefálico (*locus coeruleus*, formación reticular, núcleos mediales del rafe), diencefalo (las citadas previamente del núcleo supramamilar y aferencias procedentes del área hipotalámica lateral) y tálamo (del núcleo *reuniens* a las capas moleculares de CA1 y el *subiculum*), así como las previamente descritas en profundidad (Meibach y Siegel, 1977 a-d). Estas conexiones parecen filogenéticamente conservadas, aunque parecen de mayor importancia relativa en los primates (Herkenham, 1978; Amaral y Cowan, 1980). Estas conexiones están resumidas y esquematizadas en la Tabla 3.

Núcleo supramamilar hipotalámico	Capa Granular y molecular del giro dentado
	Capa molecular y <i>stratum radiatum</i> de CA2
Amígdala (basal)	Capa molecular de <i>subiculum</i> y <i>prosubiculum</i>
	Capa principal de CA3/CA2
Núcleos del septum y banda diagonal de Broca	Hilio de giro dentado
	<i>Stratum oriens</i> de todos los campos amónicos
	Capa piramidal y molecular del <i>subiculum</i>
	Capa molecular de CA1
	Capa molecular de CA2
	Capa molecular de CA3
Núcleo <i>reuniens</i> del tálamo	Capa molecular de <i>subiculum</i>
	Capa molecular de CA1

Tabla 3: aferencias no corticales del hipocampo

I. 3.c. EL FÓRNIX

El fórnix es un tracto de fibras que contiene tanto fibras eferentes como aferentes, que conectan la formación hipocámpica con otras áreas subcorticales (tálamo, hipotálamo y región septal entre otras). Tiene forma de C, tal como muestra el esquema de la figura 8 y en la figura 9. Por la existencia de cuatro prolongaciones a modo de pilares, dos anteriores y dos posteriores, se llama también bóveda de los cuatro pilares (de ahí su nombre; figura 10)



.Figura 8: relaciones entre fimbria, fórnix y comisuras del hipocampo en una vista medial: comisura ventral del hipocampo. 2 decusación del hipocampo. 3: comisura dorsal del hipocampo. SFO: órgano subfornical, AC: comisura anterior. Ccs: cuerpo calloso. Tomado de Rosene y van Hoesen (1977)

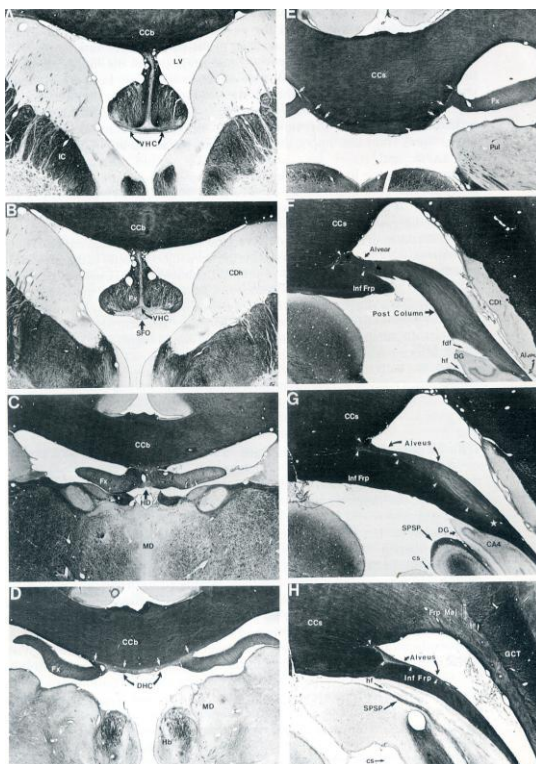


Figura 9: Cortes frontales teñidos para mielina del hipocampo y el fórnix de un macaco rhesus: Corte A-D corresponden con los niveles señalados en la figura previa como 2 A-D. Cortes E-H señalados en figura previa como 2E-H. Rosene y van Hoesen (1977)

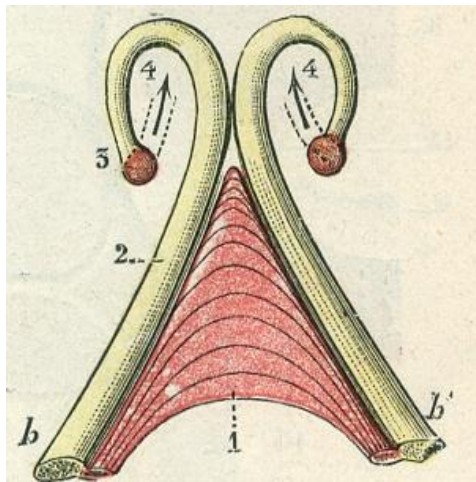


Figura 10: el fórnix, constituyendo lo que clásicamente se llamaba trígono cerebral. 1: fibras comisurales formando la lira de David. 2: fibras longitudinales dirigiéndose hacia los cuerpos mamilares 3: cuerpos mamilares. 4: fascículo de Vicq d'Azyr. a: pilares anteriores de la bóveda de los cuatro pilares. b: pilares posteriores de la bóveda de los cuatro pilares (Testut, 1922)

Las eferencias del HC parten de los axones de las células las células piramidales de CA1 que, en su raíz, constituyen el llamado *alveus* del HC: una capa de sustancia blanca que separa el asta de Amón del ventrículo lateral. Las vías eferentes que pasan por el *alveus* convergen en la *fimbria*, que puede considerarse la raíz del el fórnix. El fórnix también recoge eferencias del *septum pellucidum* y discurre por encima de la tela coroidea del tercer ventrículo formando el cuerpo (figura 11).

El *septum pellucidum* es una membrana triangular, vertical, que separa los cuernos anteriores de los ventrículos laterales, y que forma como una hoja o lámina entre el cuerpo calloso (cefálicamente) y el fórnix (caudalmente). Consiste en dos capas o laminas, cada una de ellas con sustancia blanca y sustancia gris, entre las cuales hay un espacio virtual, presente en la época embrionaria, denominada *cavum* del *septum pellucidum* —e, impropriamente, “quinto ventrículo” (Alonso y Frotscher, 1989), y que suele desaparecer en la infancia. Es debajo del *septum pellucidum* donde se identifica el fórnix (Rakic y Yakovlev, 1968) (figura 12). A lo largo de su camino, muchos axones del cuerpo del fórnix de un lado pasan al lado contrario, entretejiéndose y constituyendo una comisura de morfología triangular conocida con el peculiar nombre de **comisura del fórnix, lira de David o psalterio** (figura10). Los cuerpos del fórnix convergen en la parte anterior y se incurvan por encima de la comisura blanca anterior. Después se separan en dos columnas o pilares anteriores que se dirigen a los cuerpos mamilares. Es decir, en el fórnix pueden considerarse un cuerpo, y cuatro columnas o pilares (figura 11).

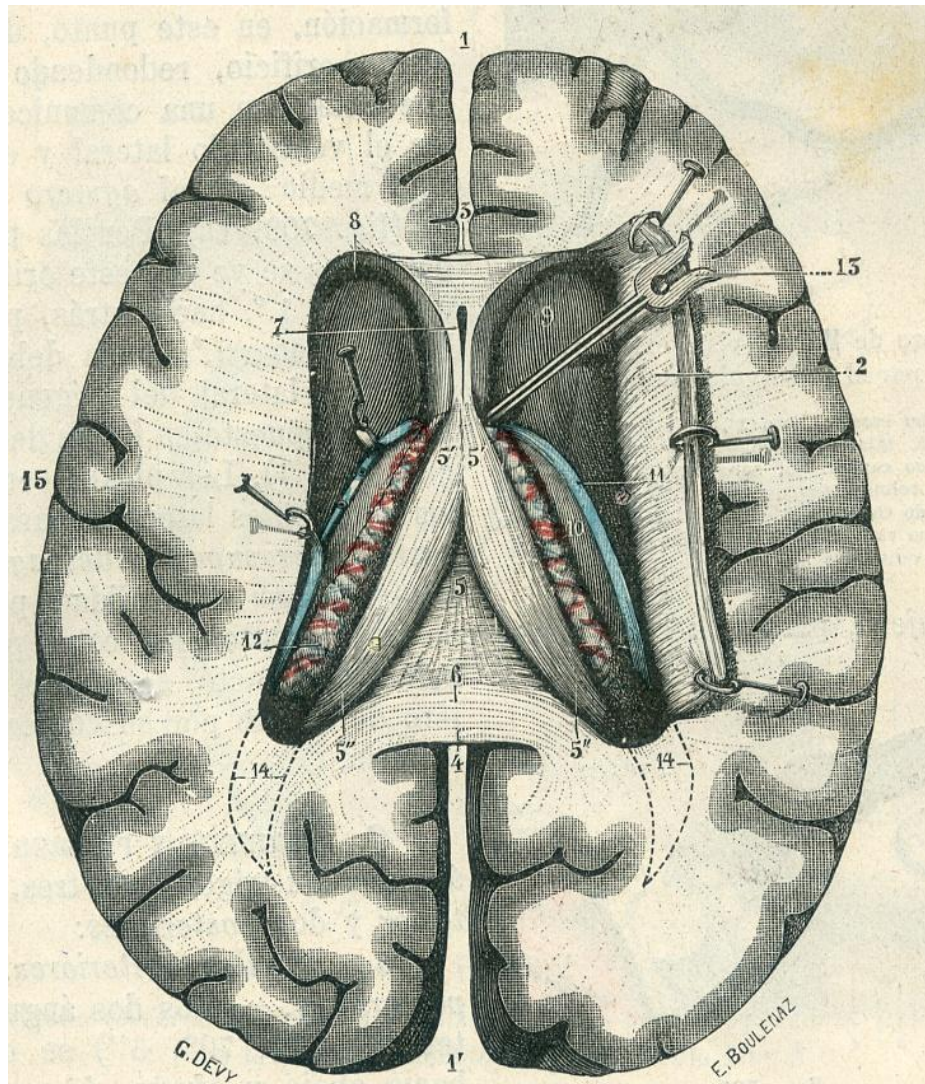


Figura 11: se muestra un corte horizontal de ambos hemisferios cerebrales tras retirar el cuerpo calloso. 1: polo anterior. 1': polo posterior. 2: representación gráfica de la disección con el cuerpo calloso retirado hacia arriba y afuera. 3: rodilla del cuerpo calloso. 4: rodete del cuerpo calloso. 5: trígono cerebral. 5' : pilares anteriores de la bóveda de los cuatro pilares. 5'': pilares posteriores de la bóveda de los cuatro pilares. 6: fusión del trígono con el rodete del cuerpo calloso. 7: Septem lúcidum y su cavidad central, llamada ventrículo del Septum por algunos autores 8: ventrículo lateral. 9: caudado. 10: tálamo óptico. 11: surco optoestriado. 12: plexo coroideo de los ventrículos laterales. 13. agujero de Monro. 14: astas posteriores de los ventrículos laterales. 15: cisura silviana. (Testut, 1922)

En general, la lira de David antes mencionada constituye uno de los sistemas de fibras que permiten la existencia de abundantes conexiones comisurales entre ambos HC (Berger et al, 1981): se pueden establecer tres sistemas comisurales en el HC de los primates: una comisura hipocampal ventral que se encuentra inmediatamente posterior al *septum* y ventral al cuerpo del fórnix, y que, en primates a diferencia de en los roedores, prácticamente no lleva conexiones del cuerpo del HC (Amaral et al, 1984); una segunda comisura del HC tiene localización dorsal y se sitúa inmediatamente inferior al esplenio del cuerpo calloso (figura 12); y un tercer sistema de fibras, transhemisférico, que tiene su origen entre las dos comisuras descritas pero que, a diferencia de las mismas, no conecta niveles homólogos de HC contralaterales sino que cruza hasta el *septum* del hemisferio contralateral, constituyendo lo que se conoce como decusación del HC (Demeter et al, 1985).

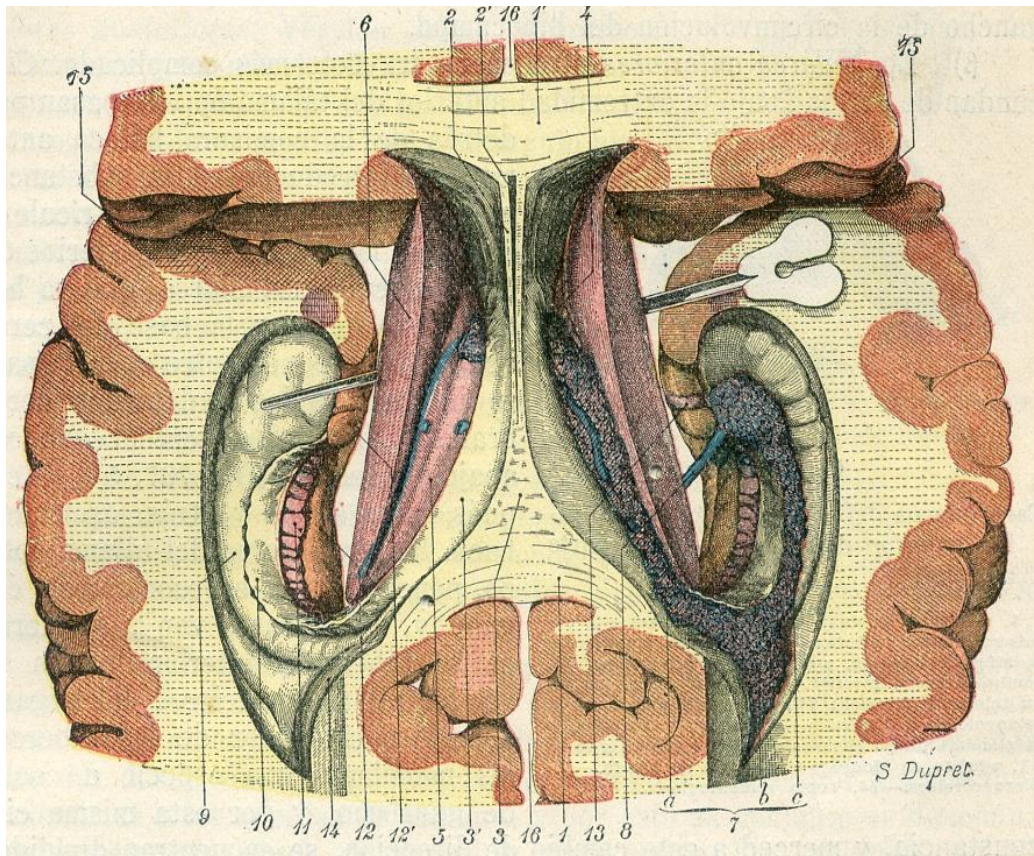


Figura 12: Suelo de los ventrículos visto desde de arriba, en una vista que permite observar el trígono cerebral en su conjunto. 1: cuerpo calloso con su rodete y su rodilla. 2. *Septum lucidum* con su cavidad. 3: trígono cerebral o fórnix y 3': pilares posteriores 4: agujero de Monro. 5: tálamo óptico. 6: caudado. 7: plexo coroideo con porción superior (a) y porción media (b). 8: vena que confluye en la vena basilar. 9: vena Amónica. 10: fimbria. 11: giro dentado. 12: circunvolución del hipocampo y uncus (12'). 13: cinta de Giacomini. 14. espolón de Morand (*calcar avis*). 15: cisura de Silvio. 16: cisura interhemisférica. (Testut, 1922)

1.3. D. EL INDUSEUM GRISEUM

Se trata de una delgada lámina que tapiza dorsalmente al cuerpo caloso, y que incluye unas estrías longitudinales que cubren al cuerpo caloso en sentido anteroposterior: dos Estrías Longitudinales Mediales y dos Estrías Longitudinales Laterales (también llamadas nervios de Lancisi), que se continúan hacia la región del esplenio donde se funden en un solo grupo, configurando la denominada *Fasciola cinerea* o giro Fasciolar.

1. 4. Irrigación

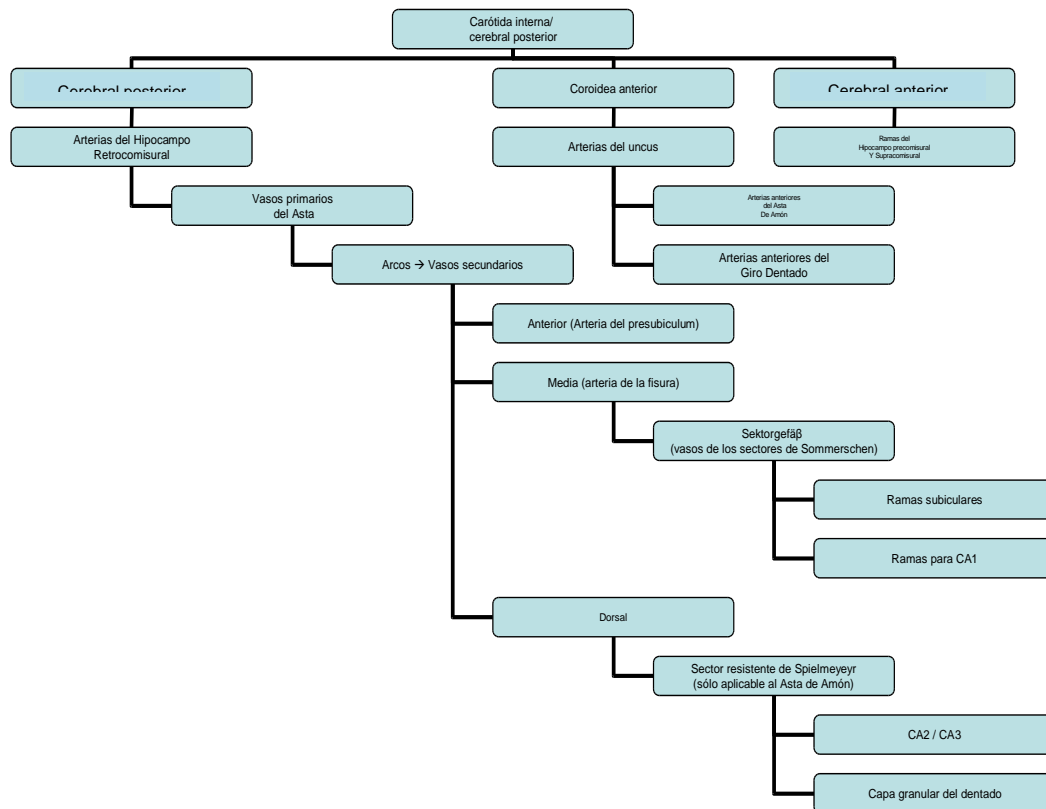
La irrigación del HC depende, por lo general, de tres sistemas arteriales distintos: cerebral anterior, que irriga el *hippocampus praecommissuralis* y el *supracommissuralis*; cerebral posterior, que irriga el *hippocampus retrocommissuralis* y la coroidea anterior, que irriga sobre todo el *uncus*. La arteria coroidea anterior, normalmente muy fina (0.5-1 mm de diámetro), nace directamente de la carótida interna (en un 80% de casos), por lo general entre la arteria cerebral media y comunicante posterior; alguna vez nace de la comunicante posterior, y alguna vez también, de la cerebral media (Stephan, 1975). Desde su nacimiento se dirige hacia atrás y afuera, siguiendo el lado externo de la cinta óptica. Al llegar a la extremidad anterior de la hendidura de Bichat se dirige a los plexos coroideos de los ventrículos laterales, irrigándolos en sus dos terceras partes. Previamente proporciona ramas a la parte anterior de la circunvolución del HC (Testut, 1922). Con cierta frecuencia se anastomosa con otras ramas arteriales. Así, se ha observado que puede haber anastomosis de las ramas del uncus, asta de Amón y *fascia dentata* con ramas de la arteria cerebral posterior; también se han descrito con la coroidea posterior y la comunicante posterior, y desde luego, con la propia cerebral media. La irrigación del uncus depende de la coroidea anterior y de un complicado sistema de anastomosis en la cabeza del HC con ramas provenientes de la cerebral posterior que transcurren por la fisura del HC (Marinkovic et al, 2012).

La arteria cerebral posterior tiene gran protagonismo en la irrigación del resto del HC (cuerpo y cola). Se trata de un vaso que suele depender del sistema vértebro-basilar, aún cuando en un 15-20% puede depender directamente del sistema carotídeo (Alpers et al.,

1959). El asta de Amón recibe irrigación por parte de esta arteria; en efecto, de ella parten de dos a cinco vasos (vasos primarios del asta de Amón, según Heiman (1937)), que se dividen posteriormente y se anastomosan entre sí, configurando varios arcos arteriales situados en superficie del HC (Erdem et al., 1993; Huther et al., 1998). El más proximal de estos vasos, que se dirige hacia el uncus, se anastomosa con una rama de la coroidea anterior, a o alguna vez con una rama atípica de la cerebral posterior. De este arco arterial nacen hasta unas 15-20 ramitas que configuran los llamados vasos secundarios del asta de Amón. De estas ramitas nacen vasos intrahipocampales: una rama anterior, una rama media y una rama dorsal. La rama anterior es corta y nutre al *praesubiculum*. La rama media es la más desarrollada y se introduce por el *sulcus hippocampi* hasta llegar al *subiculum* y a la región dorsolateral de la zona celular densa, en el terreno del sector de Sommer (en el área CA1), por lo que se denomina arteria del sector (*"Sektorgefäß"*, Uchimura, 1928); esta arteria forma una red anastomótica de la que parten pequeños vasos rectos que contribuyen a la irrigación del cuerpo y la cola del HC (Tatu y Vuillier, 2014). La rama dorsal atraviesa la capa granular e irriga de esta forma a un territorio que se corresponde con el denominado sector resistente dorsal de Spielmeyer, es decir CA2/ CA3 (Stephan, 1975). Una clasificación más reciente (Tatu y Vuillier, 2014) propone dividir la vascularización intrahipocampal en un sistema ventral y un sistema dorsal: el sistema dorsal irriga a CA3, hilio y parte de la capa granular del dentado, mientras que el sistema ventral corresponde a CA1. Existen datos contradictorios sobre la vascularización de CA2 (Tatu y Vuillier, 2014; Stephan, 1975). La irrigación del GD, aunque depende de forma importante de las arterias dorsales intrahipocampales, especialmente en su extremo hiliar (Tatu y Vuillier, 2014) parece involucrar a todos los sistemas vasculares. (Ver Esquema 1 y figura 13).

Cuando el asta de Amón enferma por problemas vasculares no lo hace de manera uniforme. Esto se debe a diferencias en la densidad de vascularización (Pfeiffer, 1940, en Stephan, 1975).

Desde el punto de vista angioarquitectónico, Pfeiffer distingue en el HC (del *Macaca mulatta*) 7 sectores angioarquitectónicos, que se relacionan bastante con sectores citoarquitectónicos: sector HE1 α , que se corresponde con el *subiculum*; HE1 β , que se corresponde con el área CA1a; HE2, con el área CA1b y HE3=CA2/3. No es clara la correlación del área angioarquitectónica HE4 con una correspondiente área citoarquitectónica. En la mayoría de



Esquema 1: irrigación del hipocampo, tratando de integrar las clasificaciones de Stephan (1975) y Tatu y Vuillier (2014).

estos campos pueden distinguirse 3 capas de “densidad capilar”. Lo que es importante desde el punto de vista de la patología vascular es que HE1β y HE2 equivalen al sector vulnerable de Sommer, y HE3 al sector resistente de Spielmeyer, que se corresponde con el área citoarquitectónica CA2/3, donde se identifican mayor número de vasos. Sin embargo, en las zonas profundas del sector de Sommer hay una gran concentración de vasos (*stratum moleculare* de CA1), que no guarda relación con la densidad celular.

Con respecto al retorno venoso del HC puede dividirse en dos grupos de venas cuyo destino final es la vena de Galeno. El mayor de los sistemas drena en la fisura del HC formando una vena de la fisura. El otro sistema recoge sangre de las venas hipocampales subependimarias y del *alveus* y termina en la pequeña fisura fimbriodentada. Ambos sistemas convergen en venas hipocampales superficiales que a su vez drenan en la vena basal, satélite de la cerebral posterior. La sangre del HC

finalmente se recoge en la vena de Galeno (Tatu y Vuillier, 2014). (Esquemmatizado en la Figura 13).

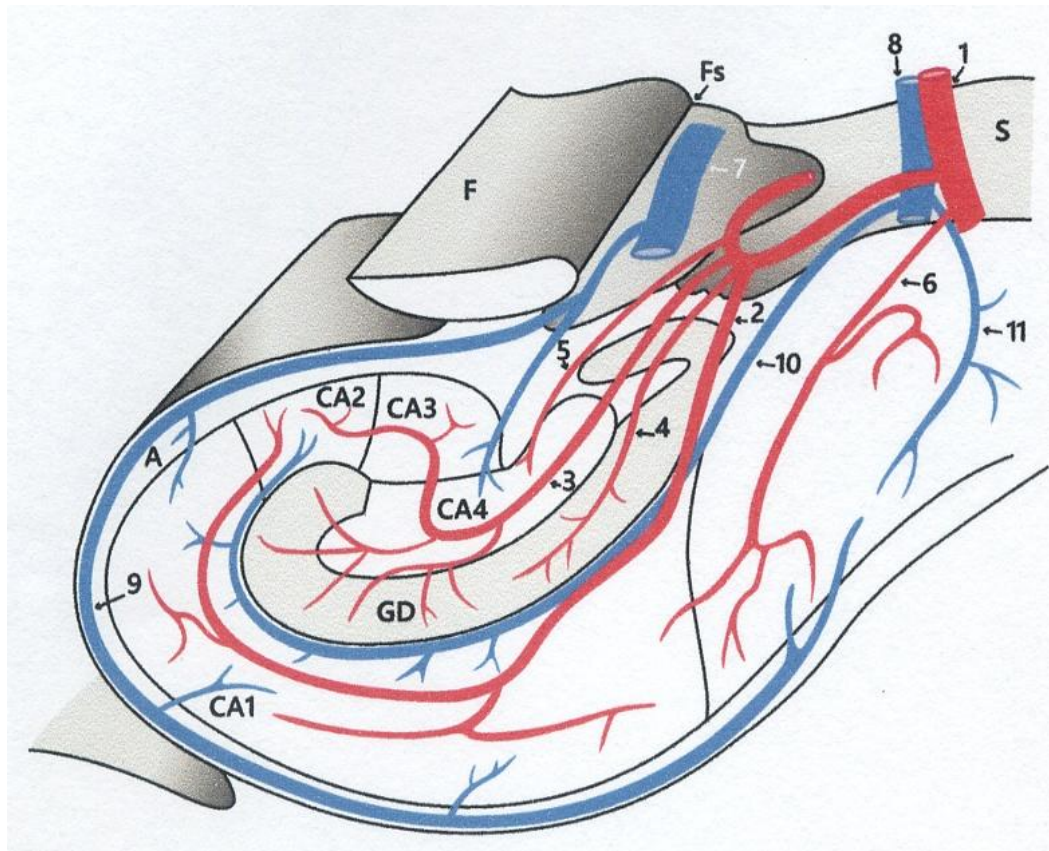


Figura 13. A: *alveus*, F: *fimbria*, Fs: *fisura fimbriodentada*, S: *subiculum*. 1: arterias superficiales del hipocampo. 2 y 4 : arterias ventrales del hipocampo, 3 y 5: arterias dorsales del hipocampo, 6: arterias subiculares 7: arco venoso superficial de la fisura fimbriodentada, 8: arco venoso superficial de la fisura del hipocampo, 9: venas intrahipocámpicas, 10: vena de la fisura, 11. venas subiculares. Tomado de Tatu y Vuillier (2014)

I. 5. El Hipocampo dorsal, el Hipocampo ventral y el Hipocampo intermedio.

El HC dorsal (HC d) y el hipocampo ventral (HC v) de los mamíferos difieren en la conectividad de tal manera que las regiones dorsales más próximas al *septum* se asocian a regiones corticales relacionadas con la cognición y las regiones ventrales situadas en polo temporal conectan con regiones implicadas en el procesamiento emocional. Así, el HC d (concretamente CA1) contiene la mayor densidad de células de lugar que codifican localización espacial (Jung et al, 1994; Muller et al, 1996) y envían conexiones a la parte dorsal del *subiculum*, *presubiculum* y *postsubiculum*. En estas

regiones subiculares dorsales reside la sensibilidad de la orientación de cabeza en el espacio (Taube et al, 1990; Amaral et al, 1991; Witter y Amaral, 2004; Taube et al, 2007; Fanselow y Dong, 2010). Mientras, el área CA1 del HC v envía proyecciones al bulbo olfatorio y a la corteza piriforme, entre otras (Cenquizca y Swanson, 2007; Roberts et al., 2007). Tanto el *subiculum* ventral como el área CA1 ventral están ampliamente interconectados con la amígdala (Cenquizca y Swanson, 2007), conexiones que juegan un importante papel en el aprendizaje mediante condicionamiento negativo (Maren y Holt, 2004). Una conexión de particular interés conductual propia del HC v proyecta al septum lateral ventral y al núcleo del lecho de la estría terminal, que a su vez se interrelacionan ampliamente con el hipotálamo (Dong y Swanson, 1996, a-c; Risold y Swanson, 2006). Sin embargo, existe un área intermedia con cierta especificidad en sus conexiones anatómicas, que recibe aferencias de la corteza entorrinal con un perfil topográfico concreto (Burwell, 2000). Por ejemplo, el área CA1 de la región intermedia del HC conecta directamente con la *tenia tecta* dorsal y el núcleo olfatorio anterior, así como con la región intermedia del *subiculum* que a su vez conecta con los núcleos laterales, basolaterales y basomediales de la amígdala, entre otros. Este patrón de conectividad implica, a un tiempo, cierta superposición y cierta especificidad del HC intermedio. Si bien el análisis promenorizado de la conectividad y la expresión genética de cada región hipocampal escapa al objetivo de este trabajo, la conectividad se correlaciona con la expresión de genes que permiten caracterizarla. Esta correlación en ocasiones es particularmente intensa, como en el CA3 ventral, caracterizado con bastante fiabilidad por la expresión de *Plagl 1* y *Coch* (Fanselow y Dong, 2010). Sin embargo, el dato más importante de la correlación molecular y funcional entre HC d e HC v es la existencia de un sustrato morfológico consistente para la misma, que Fanselow y Dong (2010) identifican como el punto en el que las neuronas piramidales de CA3 se empaquetan densamente dando lugar a una estructura con forma de X (ver figura 13b, 13 c y figura 93 de la discusión). Este punto se encontraría en la máxima extensión dorso caudal del HC.

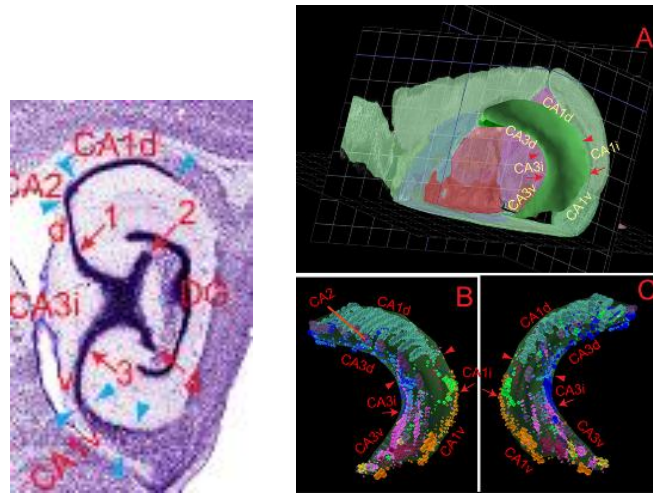


Figura 13b (izquierda) y 13 c (derecha). La frontera anatómica y molecular eentre HCd e HC v.En 13 c A se muestra un modelo del hipocampo como una estructura cilíndrica con forma de C (Fanselow y Dong, 2010)

II) DESARROLLO DEL HIPOCAMPO

A pesar de las notables diferencias que aparecen entre el HC humano y el murino (y el de otras especies de mamíferos) en todos los mamíferos el HC tiene una estructura alargada en sentido anteroposterior cuyo desarrollo no progresa al mismo tiempo que el neocórtex (Angevine, 1975) y cuyas estructuras fundamentales (el asta de Amón y el GD) poseen un desarrollo diferencial de tal forma que el asta de Amón es claramente reconocible cuando apenas hay indicios del GD y el GD continúa su formación en el período perinatal cuando el asta de Amón ya es claramente reconocible.

II. 1. Introducción al desarrollo del hipocampo.

II.1.a NEUROGÉNESIS EN EL GIRO DENTADO.

Hoy en día se reconoce al GD como un campo de gran interés científico debido a la presencia de neurogénesis adulta. Durante mucho tiempo un tabú científico, las primeras sugerencias al respecto procedieron de uno de los más destacados autores en este campo (Altman y Das, 1965). Desde entonces comenzaron a acumularse evidencias de la presencia de células con potencial neurogénico en el HC de la rata y el papel del HC en la plasticidad (Lynch et al, 1975; Kaplan y Hinds, 1977; Kim et al, 2011). La neurogénesis adulta en el GD de los primates se aceptó a partir de los trabajos de Kuhn et al. (1996), Eriksson et al. (1998), Gage (2000), y Spalding et al. (2013), y se comenzó a establecer un correlato funcional mediante el uso de ambientes enriquecidos (Kempermann et al., 1997). La relación entre el entorno ambiental y la neurogénesis en el GD se encuentra progresivamente más estudiada en diferentes especies de mamíferos (Coulon et al., 2013). Los trabajos con autorradiografía en pacientes oncológicos constituyen un hito de la anatomía humana, permitiendo demostrar la existencia de neurogénesis en el GD tras la administración pre mortem de BrdU a pacientes terminales y el estudio autopsico posterior (Eriksson et al., 1998). Otra publicación reciente con gran impacto es el trabajo de Spalding et al. (2013) quienes utilizaron la radiactividad ambiental en los años posteriores a la pruebas de bombas atómicas y la incorporación y concentración de carbono 14 en el ADN genómico humano. Estos autores mostraron que en el GD humano adulto unas 700 neuronas granulares nacen cada día, aunque esta cifra disminuye con el envejecimiento. Parece que no todas los granos recién nacidos sobreviven, ya que mueren con más facilidad que los

granos formados durante el desarrollo. Es evidente que la neurogénesis adulta en el GD (Harding et al, 1998) y su posible papel en funciones cognitivas (y su declive en enfermedades neurodegenerativas) es un tema de gran interés en la actualidad. Mención especial merece la posibilidad de influir en la neurogénesis adulta – y las funciones cognitivas- mediante el ejercicio físico (Gage et al, 1995; van Praag et al, 1999; van Praag et al, 1999; Pereira et al, 2007).

Gran parte del conocimiento sobre el desarrollo del GD humano proceden de la extrapolación de estudios en macacos (Nowakowski y Rakic, 1981). Las nuevas neuronas se originan a partir de progenitores en la zona subgranular del GD ya formado que migran a la capa granular donde se produce su diferenciación y maduración. Estos resultados son consistentes en roedores y primates. Los granos nuevamente formados tienen fenotipo de neuronas activas recién nacidas. El avance de la inmunohistoquímica permitió cuantificar este proceso a finales de los años noventa en los que se observó en el mono que aproximadamente el 0,004% de la población neuronal de la capa principal del GD en un momento dado corresponde con neuronas nacidas ese mismo día (Kornack y Rakic, 1999), una cifra mucho menor que la demostrada en roedores (Kempermann et al, 1997) y que se contradice con los resultados más recientes de Spalding et al. (2013) en humanos. Estas diferencias están ampliamente atribuidas a la diferencia de ciclo vital entre primates y otras especies de mamíferos, y a la dificultad de establecer un período de “adolescencia” comparable al humano en otras especies. Llamativamente en roedores este proceso redundaba en la adición de nuevas neuronas a la población preexistente que desarrollan conexiones sinápticas (Crespo et al, 1986; Stanfield y Trice, 1988), en aparente relación con estímulos ambientales (Kempermann et al, 1997) . Poco a poco se ha ido reconociendo la función proliferativa que en el GD tiene la glía radial, a la que previamente se le consideraba un mero andamio y sustrato de migración (Seri et al, 2001). Finalmente ha quedado establecido el potencial proliferativo de células con morfología glial radial e inmunofenotipo astrocitario. (Alvarez Buylla et al, 2001) Hay evidencia de la presencia adicional de un subgrupo de células que comparten las características inmunofenotípicas y funcionales sin mostrar fenotipo radial (Suh et al, 2007; Knöth et al, 2010). Existirían por lo tanto células madre, quizás de estirpe astrocitaria o pertenecientes a una estirpe en sí misma, que expresarían nestina, Sox 2, Doblecortina (Dcx) y Prox1 (Knöth et al, 2010; Steiner et al, 2006); el significado de la expresión de estas moléculas se explica a continuación. Anticuerpos para células en mitosis como Ki 67 han demostrado actividad en el DG humano adulto hasta edades tan avanzadas como los 62 años (Reif et al, 2006). La Dcx es un marcador de neuronas inmaduras; en HC humanos se han encontrado neuronas positivas para Dcx en muestras extraídas de cerebros hasta los 100 años

de edad. En los humanos adultos no hay una zona subgranular especialmente delimitada. En una amplia serie de casos (Knoth et al, 2010) muchas células Dcx+ en individuos jóvenes mostraban fenotipo de neuronas inmaduras, una característica que se pierde en los individuos más ancianos de la serie aunque en general se acepta que las neuronas maduras ya no expresan Dcx. Además, se ha encontrado doble inmunorreacción a Dcx y NeuN, un marcador de diferenciación neuronal, hasta la edad de 85 años. Se ha detectado inmunorreacción para Prox1, un factor de transcripción estrechamente relacionado con el desarrollo de células granulares en roedores y que frecuentemente se ha empleado para observar la migración del dentado en roedores (Pleasure et al, 2000; Steiner et al, 2008), en neuronas Dcx + en individuos ancianos (Knoth et al, 2010). Esta coexpresión se produce también con calretinina (CR). Los datos sugieren que el GD posee capacidad neurogénica durante toda su vida, aunque va disminuyendo con la edad, y que esta capacidad reside en células con potencial proliferativo e inmunofenotipo astrocitario que representan una fracción o la totalidad de la glía radial secundaria que se encuentra en el equivalente humano de la zona subgranular del GD del roedor (Sievers et al., 1992; Rickmann et al., 1987). El estudio de las moléculas de señalización intra y extracelulares que median estos procesos neurogénicos evoluciona mostrando una creciente complejidad, aunque en su mayoría está orientado hacia el HC murino. El estado quiescente de las futuras neuronas granulares del GD se regula mediante proteínas de la familia de BMP y Notch y la presencia de factores locales, como GABA (Ables et al., 2011; Song et al., 2012; Knobloch et al., 2013). La entrada en actividad proliferativa depende de reguladores de transcripción como Prox 1, Wnt y Neuro D1 (Gao et al., 2009; Mira et al., 2010; Karalay et al., 2011). A los pocos días del nacimiento las nuevas neuronas comienzan a extender dendritas en las capas moleculares del GD y axones hacia CA3 y, durante las primeras 8 semanas de su vida, sufren un proceso de selección dependiente de estímulos que condicionan su supervivencia. La naturaleza de sus conexiones y de su función, a pesar de la relativa oscuridad de los motores de este proceso, es dependiente de al menos dos sistemas de transducción intracelular: pCREB y Cdc42 (Jagasia et al., 2009; Vadodaria et al., 2013). Durante este tiempo las nuevas neuronas atraviesan un período de hiperexcitabilidad que parece ser fundamental para desarrollar una serie de respuestas que serán únicas ante un contexto determinado, y serán capaces de distinguir entornos y situaciones con un alto grado de discriminación. Esta propiedad de las neuronas del GD, llamado reconocimiento de patrones, es una de las características de la inteligencia (Mattson, 2014) y para su desarrollo es fundamental este período de hiperexcitabilidad post-nacimiento (Aimone et al., 2011; Sahay et al., 2011; Marín-Burgín et al., 2012). Pasadas estas 8 semanas los granos jóvenes quedan perfectamente integrados en el GD y su excitabilidad y características microscópicas se hacen

idénticas a las de neuronas más antiguas (Laplagne et al, 2006; Laplagne et al., 2007; Jessberger y Gage, 2014).

II. 2. La génesis del hipocampo de rata: los trabajos de Joseph Altman y Shirley Bayer.

El conocimiento sobre la neurogénesis en el HC se debe fundamentalmente a los estudios realizados por el método autorradiográfico, campo en que destacaron especialmente los trabajos de Joseph Altman y Shirley Bayer (Altman y Das, 1965; 1966; 1967; Bayer, 1980 a -c; Bayer, 1985; Altman y Bayer, 1990 a - e). En la rata la morfogénesis del HC empieza sobre el día 10 del desarrollo embrionario, antes que la mayor parte de la neocorteza, salvo las células más antiguas de la corteza piriforme. El sitio de la neurogénesis del asta de Amón es la superficie ventricular y desde ahí se disponen con la misma secuencia -de dentro a fuera- que se sigue en el resto de la corteza. Las neuronas del HC continúan naciendo hasta y durante el decimoquinto día de gestación. Las células piramidales del *presubiculum* nacen el día 16 y para el día 17 ha finalizado la formación de la región hipocampal. El *subiculum* completa su formación en torno al 15 día, mientras que tanto CA1 como CA3 tienen un período de desarrollo más largo, que se extiende hasta el período perinatal. El mayor período de neurogénesis es el que corresponde al GD: las neuronas de la capa molecular y el hilio se generan en torno al decimoquinto día embrionario pero la morfogénesis de las neuronas granulares no se completa hasta semanas después del nacimiento; además su gradiente de formación es peculiar, siendo las neuronas más antiguas las más laterales, localizadas en el brazo suprapiramidal, y las más recientes, las más mediales, localizadas en el brazo infrapiramidal. (Stanfield y Cowan, 1979). La citogénesis en el HC puede clasificarse en tres componentes diferentes: el neuroepitelio amónico, el neuroepitelio del GD y el llamado gliopitelio de la futura fimbria (Altman y Bayer, 1990, a). El neuroepitelio que va a dar lugar al asta de Amón contiene gran cantidad de células mitóticas hacia el final de la segunda semana del desarrollo embrionario; al GD lo formará un segundo componente que aparece en el punto de la invaginación de la superficie ventricular (*dentate notch*) y que se diferencia por su peculiar dinámica celular. En este caso la intensa actividad mitótica es algo más tardía y se verá representada por dos masas de células en proliferación que hacia E19 y E20 ocupan el centro del GD propiamente dicho y finalmente se limitarán a él. El gliopitelio de la fimbria está flanqueando al *notch* en sentido opuesto al neuroepitelio amónico; Altman y Bayer (1990) usan la expresión “en la punta del rudimento del HC”. Las células piramidales del asta de Amón de la rata empiezan a nacer en E10, alcanzando su máxima concentración en torno a E14 y

E15, que va desapareciendo paulatinamente hasta los últimos días de desarrollo, sobre todo en CA1 y en CA3, los últimos lugares en madurar desde el punto de vista citogenético. El *stratum radiatum* y *oriens* se forman sobre E15-E17, y el piramidal continúa formándose hasta justo antes del nacimiento, después del cual ya no hay más citogénesis en el asta de Amón.

A lo largo del desarrollo del GD pueden identificarse **tres matrices de crecimiento** sucesivas: la primera es una región ventricular que constituye la escotadura del dentado o *dentate notch*, que a partir de E16 (en rata; aproximadamente E15 en ratones) se desplaza hacia la superficie donde forma una zona de migración delimitada que constituye la segunda matriz del dentado, a lo largo de una región en la que posteriormente se situará el brazo medial del GD. El día previo al nacimiento apenas existe proliferación celular a lo largo de la migración, y la que se observa está dispuesta a lo largo de la capa granular en formación (Altman y Bayer, 1990 a). Finalmente esta proliferación se limita a la capa subgranular en donde permanece la tercera matriz del dentado, que formará la mayor parte del GD (Angevine, 1965; Bekiari et al, 2015). El esqueleto glial radial secundario se forma y persiste postnatalmente en el GD y expresa GFAP (Rickmann et al, 1987). En los roedores recién nacidos el asta de Amón es claramente identificable dado que ya está compactada la capa piramidal en su forma definitiva, pero el GD aún tiene poca consistencia en su brazo lateral y prácticamente no existe en su brazo medial si nos referimos a imágenes de células diferenciadas marcadas por autorradiografía con timidina tritiada. Bayer y Altman estimaron por este método que el 15% de las células del GD de la rata se forman antes del nacimiento. (Altman y Bayer, 1990, a).

Los estudios morfológicos clásicos, apoyados en las técnicas de autorradiografía, han sido complementados en las últimas décadas con estudios inmunohistoquímicos, existiendo un amplio panel de anticuerpos que permiten identificar distintas poblaciones celulares en distintos estadios (Tabla 4).

<i>Anticuerpo</i>	<i>Población celular</i>	<i>Referencia</i>
Nestin	Progenitores neurales	Chen, 1998
Ki 67, PCNA	Proliferación	Eisch y Mandjam, 2007 Kee et al., 2002
Prox1	Migración del dentado	Wigle et al., 1999
Dcx	Neuroblastos en proliferación y migración (“Neuronas inmaduras”)	Bai et al., 2003
NeuN	Neuronas diferenciadas	Christie et al., 2006

Tabla 4: anticuerpos utilizados en diversos estudios sobre la embriología del hipocampo.

II. 3 Desarrollo del hipocampo en primates y humanos

II. 3 .a. LA MADURACIÓN DEL HIPOCAMPO DE LOS PRIMATES

El HC de los primates y del humano, por limitaciones técnicas y éticas obvias, se mantiene como un territorio relativamente ignoto. En los humanos la maduración del HC está íntimamente relacionada con la memoria declarativa, que se ha identificado como residente en el lóbulo temporal medial (Squire et al., 2004) y es extremadamente sensible a lesiones durante el desarrollo. El desarrollo y la maduración del HC son procesos lentos tanto en el humano como en los primates antropomorfos, observándose los principales cambios morfológicos durante el primer año de vida. El reconocimiento de objetos, fuertemente influenciado por el lóbulo temporal medial, es una función que comienza a desarrollarse en el humano a los seis meses y alcanza su máximo desarrollo a los dos años de edad. Este desarrollo es relativamente paralelo o equivalente en humanos y primates (Novakowski y Rakic, 1978; Overman 1990; Overman et al., 1992). La memoria espacial, que también reside en esta región del cerebro y que es una de las funciones tradicionalmente atribuidas al HC como expusimos antes, no alcanza su principal desarrollo hasta los cuatro años de edad.

La maduración morfológica del HC parece prolongarse mucho más lejos en el tiempo que el desarrollo de sus funciones. Utilizando estudios de resonancia magnética se ha podido observar un intenso aumento del tamaño del HC desde el día del nacimiento hasta los 14 años, un crecimiento centrado en las regiones más caudales y posteriores del HC (Gogtay et al, 2006) y en los primeros cinco años del desarrollo. El desarrollo postnatal del HC humano muestra cierto dimorfismo sexual (Giedd et al., 1996). Además, el crecimiento es menor en la cabeza del HC, donde se produce a expensas del *subiculum*, que en el cuerpo y la cola, donde se produce a expensas del GD y el área CA3. Esto refuerza la idea de una cierta especialización funcional en un eje anteroposterior (Gogtay et al., 2006). Con respecto a las zonas que muestran intensa asociación funcional con el HC, los estudios de la corteza entorrinal muestran un desarrollo casi completo de la misma durante los primeros cinco años de vida, y especialmente durante el primero (Insausti et al., 2010).

II. 3. b. EL HIPOCAMPO HUMANO EN DESARROLLO.

El desarrollo morfológico del HC humano ha sido estudiado por varios autores (Godina y Barasa, 1964; Humphrey, 1964; Humphrey, 1966; Humphrey, 1967; Yan y Ribak, 1997; Seress et al., 2001; Chan et al., 2003; Abraham et al., 2004).

II. 3. B. 1. Período embrionario y fetal.

A las 9 semanas de gestación (SG), se puede observar una intensa proliferación celular en el primordio hipocampal (Yang et al., 2014). No obstante, el estudio de Yang (2014) no parece reconocer la existencia del cortical hem (estructura de la que hablaremos luego) en esta edad (Meyer et al., 2002), lo que compromete esta cronología (ver resultados y discusión). La formación hipocampal, como parte del arquicórtex, se puede diferenciar de la zona periarquicortical por la presencia de una zona marginal mucho más ancha y una placa cortical (también llamada placa amónica o placa hipocampal) más laxa y estrecha que en el resto de las zonas corticales; unos cambios que son más llamativos algunos días más adelante en el desarrollo embrionario (Kostovic et al., 1989). A las 9 SG, además de una intensa actividad proliferativa, se detecta positividad para nestina en cuerpos celulares de la zona marginal, la zona intermedia y la zona ventricular, que extiende procesos hacia la zona marginal y la placa hipocampal. Se puede observar una progresiva acumulación de células inmaduras reactivas para

Dcx en todas las capas salvo la zona ventricular (Yang et al., 2014). A las 13SG se aprecia positividad a calbindina (CB), sobre la que se hablará ampliamente, en el asta de Amón y en la fimbria, especialmente en el HC d (Pueyo Morlans, 2014). A las 14 SG el rudimento del HC es claramente identificable, y se puede observar un gran aumento de la proliferación celular en torno a la zona granular y el hilio; en cambio los procesos inmunorreactivos para nestina que se extienden a la placa hipocampal se hacen menos evidentes; comienza a aparecer inmunorreacción para CR en el fórnix y la tenia del fórnix (Yang et al., 2014).

A las 12 SG se constata la desaparición del cortical hem (Abraham et al., 2004), y se puede ver el desarrollo del HC d en los niveles caudales al naciente esbozo del cuerpo calloso. Precisamente, la tenia del fórnix parece ocupar la misma posición que ocupaba el cortical hem antes de las 13 SG. La CR permite delimitar en estas edades con claridad la fisura del HC humano, tanto a nivel ventral como a nivel dorsal. La fisura del HC también muestra inmunotinción para Reelin, lo que indica la presencia de neuronas de Cajal Retzius en la profundidad de la misma, especialmente a nivel de la zona marginal. La CR es un marcador de las neuronas Cajal Retzius en la zona marginal (Abraham et al., 2004). Algunas de estas neuronas muestran expresión de otra proteína ligante del calcio, la CB, que se expresa de forma llamativa en la base de los plexos coroideos. Además, la CB permite identificar las capas de células piramidales del asta de Amón dorsal y ventral (Pueyo Morlans, 2014). Comienza a observarse una distribución progresivamente mayor de células positivas para NeuN en la zona marginal y la placa hipocampal (Yang et al., 2014). A las 13 SG se observan fibras en la zona intermedia, muchas de ellas positivas para la CR. En general, a las 13 SG se reconoce la placa Amónica del HC dorsal, así como un primordio del GD. Los primeros signos de formación del GD comienzan a tomar cuerpo en este período (Yang et al., 2014; Abraham et al., 2004).

Al término de las 17SG el número de neuronas que expresan CR ha aumentado significativamente en todas las capas. A nivel hipocampal la zona ventricular ha desaparecido prácticamente como capa neurogénica y se observa una mayor celularidad en la zona subventricular. A finales del segundo trimestre del desarrollo intrauterino (22 semanas) comienza una disminución progresiva de la actividad mitótica, la cantidad de neuronas inmaduras teñidas con Dcx y nestina. Con NeuN se advierte una progresiva maduración de los campos amónicos y algunas zonas en el brazo suprapiramidal del dentado (Abraham et al., 2004; Yang et al., 2014; Cipriani et al., 2015).

Estos resultados, obtenidos en los últimos años, completan estudios previas (Seress et al., 2001) que afirman una maduración casi completa de los campos CA1 y CA3 antes del tercer trimestre del desarrollo intrauterino.

A las 32 SG sigue existiendo actividad mitótica en la zona marginal del GD y el hilio. Esta actividad se detecta con marcadores de proliferación como Ki-67. Las estimaciones más amplias establecen que el porcentaje de proliferación de los granos del dentado en las últimas semanas del embarazo es apenas el 1 % del total de células mitóticamente activas en esta zona del HC (Abraham et al., 2001; Seress et al., 2001; Yang et al., 2014;). Con la tinción de NeuN se observan todos los campos amónicos perfectamente dibujados y se pueden distinguir ambos brazos del dentado, aunque no la unión entre ellos. La maduración del *subiculum* en estas edades aún es incompleta (Yang et al., 2014).

II. 3. B. 2. El desarrollo postnatal del hipocampo a nivel macroscópico.

Giro dentado.

Al nacimiento el GD humano constituye una estructura curva visible en la superficie del cuerpo del HC, y muestra forma circular en cortes horizontales. Su extremo rostral es una región de aspecto aparentemente atrófico conocida como banda de Giacomini. La complejidad del GD humano que se observa en secciones histológicas es debido a la presencia de profundas indentaciones que le dan nombre. El extremo caudal del HC es la *fasciola cinerea*. Los extremos rostral y caudal se definen en el HC humano dado su particular desarrollo diferencial, que será comentado en profundidad más adelante. A nivel celular, en el HC del humano recién nacido se reconocen sus tres capas. Externamente a la capa granular del GD se observa la capa molecular, que limita directamente con la superficie pial de la obliterada fisura del HC (Insausti et al., 2010). Se ha estimado en diversas especies de mamíferos que la mayor parte de las neuronas de la capa granular del dentado y una parte importante de las células de la glía radial secundaria nacen postnatalmente. Durante el primer año de vida humana se produce una intensa maduración neuronal en el HC y un aumento de la sinaptogénesis, que le aportan una morfología similar a la del adulto, con dendritas ricamente arborizadas y un aumento, en primates, de al menos un 30 % en su celularidad (Lavenex et al., 2007). Como ya se ha comentado, esto parece una diferencia no desdeñable entre primates y humanos, por un lado, y roedores por otro. En los roedores la maduración postnatal parece involucrar a una mayor cantidad relativa de neuronas, mientras que

en mamíferos más cercanos filogenéticamente al ser humano la proliferación celular postnatal es relativamente menor (Eriksson et al., 1998; Insausti et al., 2010; Hunsaker et al., 2014). Al nacimiento es reconocible la morfología macroscópica definitiva del GD, aunque la capa de células granulares muestra un aspecto redondeado e inmaduro que se va definiendo a lo largo del primer año de vida, lo que se acompaña de un aumento de volumen de la capa granular a expensas del desarrollo de la sinaptogénesis tanto en humanos como en primates (Lavenex et al., 2007; Insausti et al., 2010). Existen datos que sostienen un aumento en volumen debido a la sinaptogénesis. La mielinización del HC humano es un proceso tardío que no se completa, al menos, hasta la madurez sexual (Arnold y Trojanowski, 1996).

Asta de Amón:

A partir del nacimiento, el área CA3 sufre un proceso de maduración en cuanto a tamaño y densidad similar o paralelo al del GD, aumentan las espinas o excrescencias sinápticas características de las neuronas piramidales (*thorny excrescences*). Las fibras musgosas se pueden discernir claramente en los últimos momentos del desarrollo intrauterino y aumentan progresivamente durante el primer año postnatal. El *stratum lucidum* tiene un desarrollo que, en primates, parece enlentecido con respecto a otras especies, así como las ramificaciones de las proyecciones basales de las neuronas piramidales hacia el *stratum oriens* y el *stratum lacunosum – moleculare* (Insausti et al., 2010).

El área CA2, que para muchos autores constituye una transición entre CA3 y CA2, carece de *stratum lucidum* pero muestra un desarrollo similar al descrito para CA3. En general, la principal característica morfológica del desarrollo postnatal es una progresiva mayor definición de CA1 (Arnold y Trojanowski, 1996). Las dendritas de las pirámides de CA3 que establecen sinapsis en el *stratum lacunosum moleculare* y el *stratum oriens* muestran una maduración lenta en primates (Seress y Ribak, 1995). Con respecto a CA1 su estructura y tamaño está bien establecido al nacimiento (Arnold y Trojanowski, 1996) aunque mantiene un desarrollo en tamaño y complejidad comparable al descrito para CA3. Sus aferencias desde la corteza entorrinal ya están presentes en el tercer trimestre intrauterino aunque el desarrollo total de las conexiones de CA1 se completa, probablemente, durante la adolescencia, con el desarrollo postnatal de la vía perforante (Benes, 1989).

III) EL CORTICAL HEM, p73 Y LAS CÉLULAS DE CAJAL - RETZIUS EN EL DESARROLLO DEL HIPOCAMPO

III. 1. *El cortical hem*

El cortical hem o limbo cortical (figura 14) se ha propuesto como un centro de señalización que se encuentra en el punto donde convergen el primordio del HC y el plexo coroideo, es decir, en el extremo más medial de la corteza (Grove et al, 1998). Este centro de señalización se define en el ratón por la expresión de proteínas de las familias Wnt y BMP y es el origen de las neuronas de Cajal Retzius que migran tangencialmente hacia la superficie cortical (Meyer et al., 2002). De hecho en el ratón mutante para p73 estas neuronas no se forman en el cortical hem, y en aquellos ratones en los que ha sido abolido genéticamente el cortical hem son indetectables (Meyer et al., 2002; Meyer et al., 2004; Medina Bolívar et al., 2014). El cortical hem es un derivado de la placa el techo y se considera clave para la regionalización cortical y el desarrollo del HC (Grove y Tole, 1999), Asimismo, es posible que la actividad del cortical hem condicione de alguna manera la cantidad de células de Cajal Retzius que alcanzan la corteza, algo que está apoyado por el hecho de que en el ser humano es una estructura mucho más prominente y diferenciada que en los roedores (Meyer, 2010).

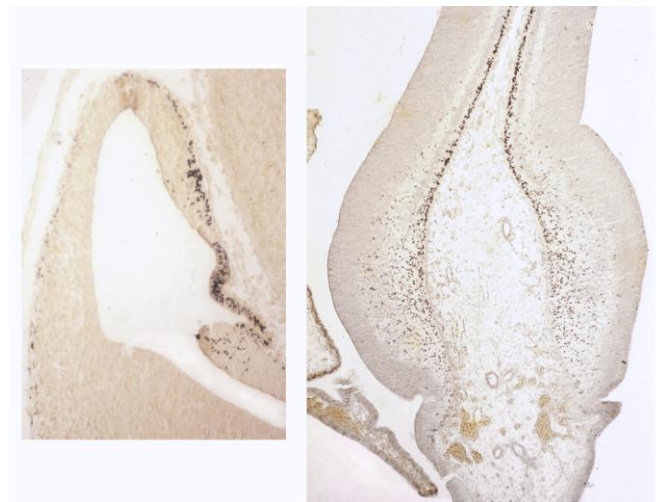


Figura 14: El cortical hem murino (izquierda) y humano (derecha) teñido con p73 (Células de Cajal Retzius).

Las neuronas de Cajal Retzius del humano empiezan a producir Reelin solamente cuando han alcanzado la futura fisura del HC, cuyo punto de arranque es adyacente al hem. Cuando, a las 9SG, se forma el primordio del HC d, el hem deja de producir células de Cajal Retzius (y en general comienza a regresar) y va siendo ocupado lentamente por la futura fimbria (Meyer et al., 2002).

El concepto de hem se ha ampliado, y hoy por hoy existen autores (Meyer, 2010; Roy et al., 2013) que consideran que el hem es un sistema complejo (figura 15) de señalización que tiene su centro estructural en el plexo coroideo y que aporta neuronas de Cajal Retzius en dirección dorsal y ventral. Además, estas neuronas no se limitarían a la corteza, sino que se dirigirían en dirección anterior (hem del septum) y hacia la amígdala (Subramanian et al., 2009; Meyer, 2010; Roy et al., 2013).

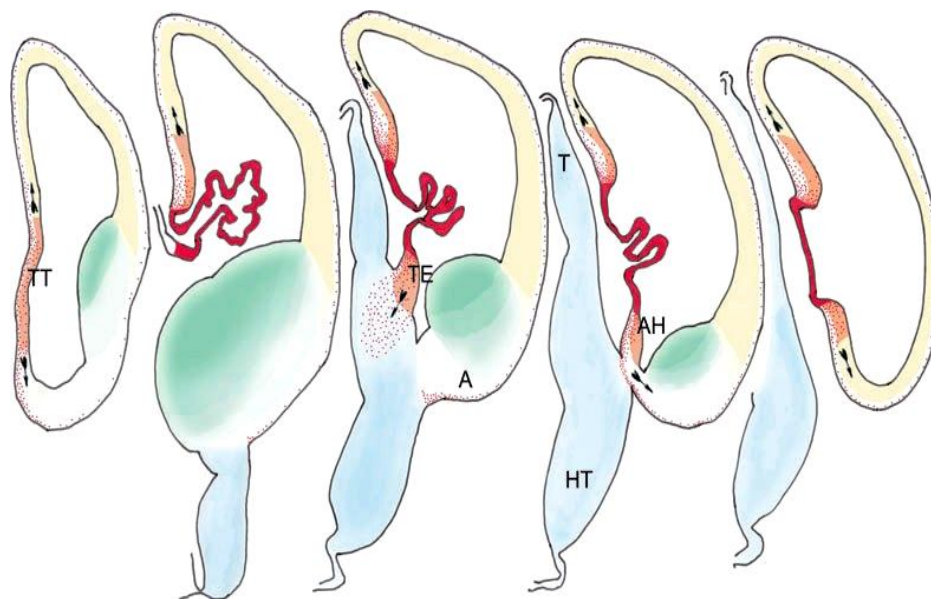


Figura 15: El sistema del hem en una sucesión de esquemas que representan cortes coronales. TE= eminencia talámica; AH: hem amigdalario; A= amígdala; dHC, vHC: hem del hipocampo dorsal y ventral . Meyer, G (2010)

III. 2. Las neuronas de Cajal Retzius

Las neuronas de Cajal Retzius fueron descritas mediante el método de Golgi por Cajal en animales y neonatos humanos y Retzius en fetos humanos (figura 16) (Ramón y Cajal, 1891; Retzius, 1893). Durante mucho tiempo su función permaneció oscura, hasta que D'Arcangelo demostró que son las principales productoras de Reelin en la corteza de los mamíferos (D'Arcangelo et al, 1995), lo que las sitúa en una posición central a la hora de explicar el desarrollo de la corteza. Las células de Cajal Retzius alcanzan la zona marginal por migración tangencial subpial (Meyer et al, 2000).

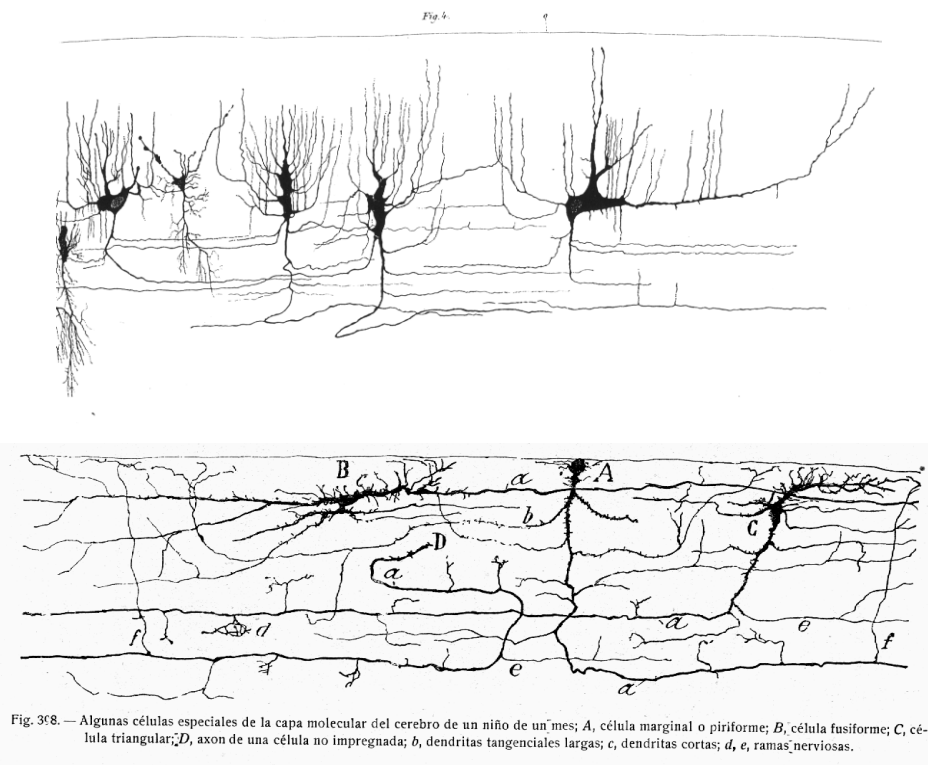


Fig16 (arriba), 17 (abajo): Esquemas originales de Cajal de las neuronas de Cajal Retzius.

La proteína p73 es imprescindible para la formación de estas células, dado que están completamente ausentes en el ratón KO p73 (Yang et al., 2000). En cambio, la proteína de la matriz extracelular Reelin no es fundamental para estas células, dado que en el ratón mutante *reeler* mantienen su presencia. Otros marcadores que permiten localizarlas son la acetil colinesterasa (humano) (Meyer y González Hernández, 1993) , la CB y la CR, aunque su

expresión más específica, que las define desde el punto de vista neuroquímico, es la positividad conjunta para Reelin (figura 17) y p73 (figura 18) (Meyer et al, 2002). Como toda neurona excitatoria antigua de la corteza, son positivas para Tbr1 (Hevner et al, 2003).

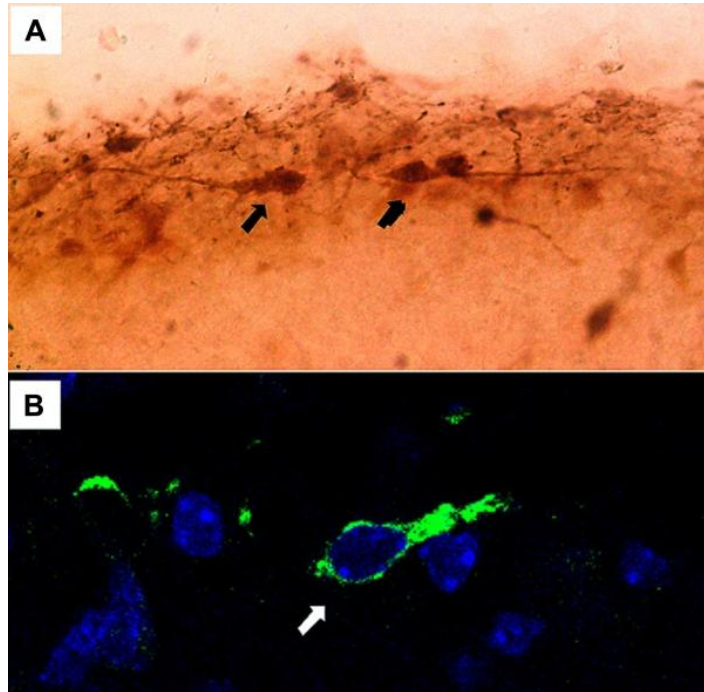


Figura 18: células de Cajal Retzius en la zona marginal teñidas con calretinina (A) y Reelin (B). Tomado de Gil et al (2014).

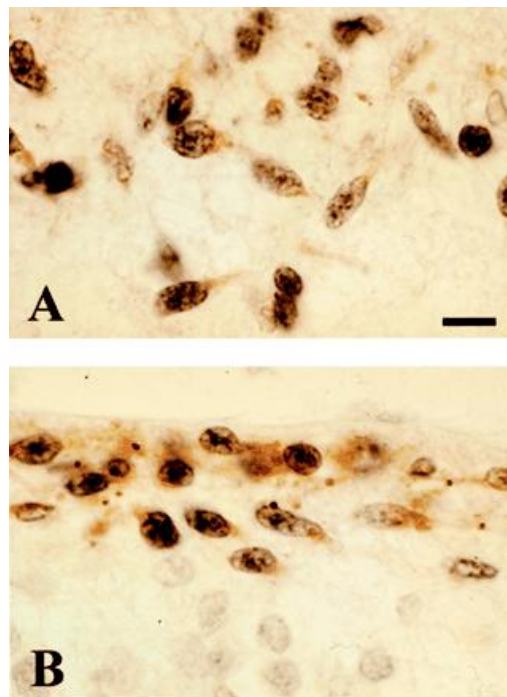


Figura 19: Coexpresión de p73 y Reelin en células de Cajal Retzius del cortical hem (A) y la corteza dorsomedial (B). Tomado de Meyer et al, 2002.

III. 3. El papel de Reelin y las neuronas de Cajal Retzius en el desarrollo del hipocampo

En ratón, en los estadios embrionarios entre E12 y E14 la región del HC muestra intensa expresión de Reelin en las células de Cajal Retzius. Esta expresión comienza a hacerse visible en la zona marginal, antes de que se comiencen a definir las capas piramidales de los campos hipocámpales (Choi et al, 2006). Una de las primeras funciones descubiertas para las neuronas de Cajal Retzius hipocámpales durante el desarrollo embrionario es la de funcionar como conexiones transitorias de las aferencias entorrinales al HC y la laminación del asta de Amón (Soriano et al, 1994; del Río et al, 1995; del Río et al, 1997; Lambert de Rouvroit y Goffinet, 1998; Meyer et al, 2002; Abraham et al, 2004)

El ratón *reeler* muestra un fenotipo hipocámpal donde se conservan las relaciones básicas, y a pesar de las malformaciones, existe fisura del HC. Sin embargo, se observa una desorganización en las capas del asta de Amón y especialmente en el GD, donde las neuronas granulares llegan hasta la misma superficie pial. El número de células de la glía está conservado, pero estas células no se arborizan correctamente y no contactan con la superficie pial (Weiss et al., 2003; Zhao et al., 2004). La malformación de la glía radial en el HC es más llamativa que en la corteza (Weiss et al, 2003). Así mismo, las aferencias entorrinales alcanzan el estrato *lacunosum-moleculare* con retraso (Frotscher et al., 2003). En el HC se interpretan como principales funciones de Reelin la orientación de la glía radial y la estabilización de los granos del GD en su posición definitiva (Haas et al., 2002; Weiss et al, 2003). En cambio, los ratones mutantes para los receptores de Reelin muestran malformaciones más complejas: el mutante ApoER2 muestra una capa adicional de células paralelas al estrato piramidal del asta de Amón e irregularidades en la organización celular (Drakew et al., 2002; Gebhardt et al., 2002; Weiss et al., 2003). Estas alteraciones también están presentes en menor medida en el mutante para VLDLR, que además muestra un llamativo aumento de la positividad para Reelin en interneuronas. En conjunto estos trabajos muestran la importancia de la vía Reelin-Dab1 en el desarrollo del HC (Rice y Curran, 1999).

El papel de Reelin parece ser fundamental en la formación del esqueleto glial secundario del HC (Luque et al, 2003); de esta manera las neuronas del HC no responden a Reelin en cultivos celulares, a diferencia de las células GFAP + que constituyen la glía radial secundaria en el GD. En el ratón *reeler* el esqueleto glial secundario del GD se forma pero no se extienden los procesos radiales, sino mantienen una disposición desorganizada con procesos cortos similares a

los de la glia astrocitaria (Weiss et al, 2003) . Este hallazgo se reproduce en los ratones *scrambler*, deficientes para Dab1 (Meyer et al, 2003; Meyer, 2007). La ablación de las neuronas de Cajal Retzius con ácido domoico y otros tóxicos supone que las células gliales pierden parte de sus procesos apicales (Hartmann et al, 1992; Del Rio et al, 1996; Super et al, 1997;). Todos estos datos sugieren una importancia capital de la secreción de Reelin para la formación del GD al regular el esqueleto glial y por lo tanto determinar su morfogénesis (Eckenhoff and Rakic, 1984; Rickmann et al., 1987, Förster et al, 2002).

.

La zona neurogénica transitoria que se forma debajo de la pia durante el desarrollo antes de que se establezca la definitiva transición de los precursores hacia la zona subgranular y el hilio dentado depende de dos sistemas que se sitúan subpiales: la vía Reelin-Dab1 dependiente de las células de Cajal Retzius y la vía SDF1/Cxcr4 dependientes de las capas meníngeas conjuntamente con las células de Cajal Retzius (Bagri et al., 2002; Lu et al., 2002; Borrell and Marin, 2006; Paredes et al., 2006; Tiveron et al., 2006; Li et al., 2008; Lopez-Bendito et al., 2008;)

IV) FUNCIONES DEL HIPOCAMPO

El HC juega un papel esencial en el almacenamiento y procesamiento de la memoria tal y como demuestra el caso del paciente Henry Molaise (Scoville y Milner, 1957), estudiado por un conjunto de más de 100 investigadores durante su vida e incluso después de su muerte en 2008 (Augustinack et al., 2014). Una alteración del HC genera una pérdida de memoria anterógrada, parte de la retrógrada, y la incapacidad de autocontrol (Scoville y Milner, 1957; Corkin 1984). El HC es por lo tanto un centro esencial en la configuración del comportamiento humano y en el aprendizaje y desarrollo de funciones cognitivas y afectivas

Por todas esas razones, por su función en conductas propiamente humanas, el conocimiento detallado del HC es muy importante. Piedra angular de este conocimiento es el análisis pormenorizado de su desarrollo prenatal, objetivo principal de este trabajo. Recientes estudios, premiados con el premio Nobel de Medicina en 2014, muestran que determinados grupos celulares del HC constituyen auténticos mapas cognitivos. De hecho, las células de lugar (“place cells”; Ekstrom, 2003) funcionan como mapas mentales muy específicos. El desplazamiento aloéctrico y la representación aloéctrica espacial descansan en gran medida en una indemnidad de estructuras hipocampales (Ekstrom et al, 2014), Sin duda, estas células no sólo se activan por estímulos topográficos, sino que también forman parte de otro tipo de recuerdos, en contextos muy diferentes (Raudies y Hasselmo, 2014). Se sabe que el HC derecho está más orientado a responder ante estímulos espaciales, mientras que el HC izquierdo se asocia con otro tipo de información contextual. Al parecer es la zona CA1 (el clásico campo de Sommer) la más sensible a la isquemia; lesiones vasculares a ese nivel generan un cuadro de amnesia, con incapacidad para adquirir información nueva, con preservación de la memoria remota (Marinkovic et al, 2012).

La memoria es un proceso complejo en el que intervienen diversas áreas cerebrales. Nuestro quehacer diario requiere la utilización de una información almacenada que nos permita llevar a cabo determinadas tareas a corto plazo, incluyendo lectura o adquisición de nuevos conocimientos. Es lo que se denomina *memoria operativa o de trabajo* (“*working memory*”), concepto introducido por Miller et al. (1960), en cuya base neurofisiológica juega un papel el HC conjuntamente con áreas de la corteza prefrontal, cuya actividad permite mantener en funcionamiento una información adquirida para desarrollar una acción concreta (Lum et al, 2012; Baddeley, 2012; Winston et al, 2013). Estas neuronas se conectan con estructuras

neuroanatómicas del lóbulo temporal –quien da significado al recuerdo- y occipital –quien da soporte visual al mismo, configurando el “entorno geográfico” de la información almacenada. Se puede disponer así de forma inmediata de la información relevante necesaria para el desempeño de una acción concreta (Baddeley et al, 2011). Además, una adecuada neuronogénesis adulta es también necesaria para su buen funcionamiento, y parece ser que la IGF-2 está involucrada en este hecho (Ouchi et al, 2013). Curiosamente, al parecer el exceso de memoria a largo plazo puede interferir con la memoria operativa. Es necesario el olvido de información no relevante para que la memoria operativa funcione de manera adecuada (Payne and Sekuler, 2014)

Otra forma de memoria es la denominada *memoria procedimental* (“*procedural memory*”) que atañe al recuerdo de las habilidades motoras y de ejecución necesarias para realizar una tarea (por ejemplo, conducir un vehículo, o leer, aprender reglas gramaticales o de sintaxis; Ullman, 2004). Suele funcionar a un nivel inconsciente, de tal manera que el acceso a estos recuerdos y su utilización se realiza sin la necesidad de una atención o control conscientes. La base neuroanatómica de la misma es compleja, pero no parece intervenir el HC. Se contrapone a la así denominada *memoria declarativa* y *episódica*, también una forma de memoria a largo plazo que consiste en la codificación, almacenamiento y utilización de datos concernientes a experiencias personales (la “memoria episódica”), así como de datos “exógenos”, relacionados con el entorno (“memoria semántica”; Eichenbaum 2004). Desde el punto de vista neurofisiológico el órgano subyacente principal es el HC (Eichenbaum, 2000). Parece ser que con el tiempo la función del HC decae, y la recuperación de los datos almacenados en la memoria se hace más dependiente de la corteza (Kitamura e Inokuchi, 2014).

El primordial papel del HC en el aprendizaje y almacenamiento y procesamiento de memoria queda perfectamente ilustrado por el caso de Henry Molaison, afecto de epilepsia intratable, que fue sometido a lobectomía bitemporal medial, con extirpación de las dos terceras partes anteriores de HC, parte de corteza parahipocampal, parte basolateral de la amígdala, y de la corteza entorrinal. No obstante, permaneció intacta la cola del HC, y el área de transición amígdala-hipocampal (Augustinack et al., 2014; Dossani et al., 2015). Este procedimiento quirúrgico tuvo un cierto éxito en lo que respecta las crisis epilépticas, que se hacían menos frecuentes, pero el paciente quedó con graves trastornos de la memoria: no era capaz de incorporar nueva información a su memoria, por lo que su capacidad de aprendizaje conceptual y semántico se vio comprometido; sin embargo, no había disminución de su inteligencia. Su

amnesia retrógrada estaba graduada temporalmente. La lesión de la amígdala era probablemente la causa de su falta de miedo (Augustinack et al., 2014). Es notable que Henry Molaison era capaz de adquirir nuevas habilidades procedimentales (motoras), pese a no ser capaz de recordar haberlas adquirido (Scoville y Milner, 1957; Corkin, 1984). Así, el paciente Henry Molaison proporcionó la base para la distinción entre la memoria explícita o declarativa- dependiente del HC- y la memoria implícita o de hábitos - independiente del HC (Milner, 1989). El hecho de que en este paciente se mantuviera intacta la cola del HC puede explicar su limitada capacidad de reconocer personajes públicos famosos incluso después de su intervención (Augustinack et al., 2014).

Henry Molaison fue el primero -pero no el único- paciente con lesiones del HC descrito en la literatura. Así, Insausti et al. (2013) describen el paciente E.P. con lesiones más extensas de todo el HC, con manifestaciones amnésicas incluso mas severas que las de Henry Molaison.

La actividad neurogenética en el HC persiste hasta fases avanzadas de la vida (Eriksson et al., 1998; Suzuki et al (2005) encontraron que el HC sufre un marcado aumento de volumen, especialmente en varones. Benes et al, en 164 individuos encuentra que el proceso de mielinización es especialmente intenso en las dos o tres primeras décadas de vida, especialmente en mujeres, aunque persiste a lo largo de la vida, en concordancia con Knoth et al (2010). Estos autores encuentran que la neuronogénesis, aunque persiste toda la vida, es máxima en la adolescencia y juventud, hasta los 30-40, en la zona granular del GD.

Como ya mencionamos en el apartado de las conexiones del HC, el estudio funcional del HC ha dado un salto en complejidad con el descubrimiento de las células de lugar (*place cells*) (O'Keefe 1976; Moser et al., 2008), y las células ortogonales de la corteza entorrinal (*grid cells*), merecedores del premio Nobel de medicina de 2014 (Moser y Moser, 2013). Las *grid cells* son células con un patrón de excitación y descarga específico que se organizan en campos hexagonales simétricos dispuestos de forma regular en función de tres parámetros: el eje del hexágono que forman, su disposición a lo largo del eje x - y y la distancia entre ellos (O'Keefe y Dostrovsky, 1971; Hafting et al, 2005, Moser et al, 2008; Boccara et al, 2010). Estas células, investigadas fundamentalmente en rata, muestran un patrón de descarga característico y específico por grupos que varía con la posición del animal en el espacio (O'Keefe y Recce, 1993; Lengyel et al, 2003; O'Keefe y Burgess 2005; Giocomo et al, 2007). Las células de lugar, que se encuentran en el asta de Amón, producen estímulos eléctricos en función del entorno en el que se encuentran (Muller et al, 1987; Colgin et al, 2008; Moser y Moser, 2014). No obstante, las

células piramidales del asta de Amón producen también estímulos eléctricos que siguen patrones en función de estímulos no espaciales como textura, olores, o colores (Young et al, 1994; Wood et al, 1999; Leutgeb et al, 2005; Deguchi et al, 2011). Estas células son capaces de realizar dos funciones esenciales para la orientación temporal y espacial como son la compleción de patrones y la separación de patrones. La compleción de patrones se demuestra por la capacidad de las células de CA3 y CA1 de mantener su especificidad en relación con los estímulos aún después de la desaferentización (Nakazawa et al, 2002, Moser et al, 2008). La separación de patrones reside en la capacidad de estas células de alterar su estado en respuesta a mínimas variaciones ambientales (Muller et al., 1987; Bostock et al, 1991; Markus et al, 1995; Wood et al, 2000). Esta capacidad de las neuronas piramidales de los campos amónicos se encuentra íntimamente relacionada con el procesamiento previo de los estímulos por las neuronas granulares del GD (Leutgeb y Moser, 2007; McHugh et al, 2007) y las sinapsis que establecen con las células piramidales de CA3 (Claiborne et al, 1986). El papel de los granos del dentado en el establecimiento de patrones y la separación de patrones reside en su capacidad de establecer sinapsis con las células piramidales específicas y condicionadas por el medio únicamente durante los primeros días después de su nacimiento y de activarse a partir de ese momento ante condiciones similares ; Gage, 2010; Sahay et al, 2011; Yu et al, 2013; Rangel et al, 2013).

IV. 1. Aplicaciones clínicas.

Dado el carácter central del HC en funciones cognitivas humanas como la memoria declarativa y emocional, el conocimiento en profundidad de su desarrollo y una adecuada correlación clínico patológica son fundamentales para un ulterior avance en la comprensión de ciertos trastornos. Aunque gran parte de la información clínica sobre el HC humano procede del desafortunado caso de Henry Molaison, la correlación abarca un espectro más amplio de enfermedades neurológicas y neuropsiquiátricas:

Se ha encontrado correlación entre el tamaño del HC y el cociente intelectual verbal en niños y adolescentes (Schumann et al, 2007). Además, se sabe que el HC es especialmente sensible al alcohol que altera especialmente la capacidad de aprendizaje y la memoria, y también predispone a la adicción (Hollway et al., 1979). El patrón compulsivo de ingesta alcohólica, con consumo de grandes cantidades de alcohol de una sola vez (“binge drinking”), daña especialmente los

circuitos neuronales del HC, probablemente por acción de citocinas y daño oxidativo, así como por excitotoxicidad (Zhou and Crews, 2005). Se sabe que el alcohol acelera la neurodegeneración e induce apoptosis, al tiempo que bloquea la neurogénesis. Estudios posteriores (Burke et al, 2009) han venido a confirmar estas observaciones iniciales. El HC es también un órgano diana de drogas como cocaína (Chambers et al., 2010) u otros simpaticomiméticos (Giannaccini et al., 2007) como metanfetamina, inhibidor, al igual que el etanol y otras drogas, de la neurogénesis hipocampal (Recinto et al., 2012).

Los accidentes obstétricos que generan lesiones hipóxicas del HC provocan un déficit de la memoria episódica que no es compensado en posteriores estadios del desarrollo (Vargha Kadem et al, 1997; Bachevalier y Vargha Kadem, 2005).

La corteza entorrinal, íntimamente relacionada con el HC, tiene un menor desarrollo en los portadores del alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E, uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo del Alzheimer precoz.

La patología hipocampal con más consecuencias clínicas conocidas es la esclerosis mesial, una de las malformaciones epileptógenas mejor caracterizadas, en la que el HC adquiere un aspecto cicatricial merced a la reorganización del GD con lesión de las fibras musgosas y pérdidas neuronales en CA1. La relación funcional y clínica entre el HC y la corteza entorrinal se demuestra en la degeneración paralela de las neuronas de la capa III de la misma; en las situaciones extremas, la extirpación de la corteza entorrinal puede lograr un adecuado control quirúrgico de las crisis comiciales (Houser 1990; Babb et al, 1991; Mathern et al, 1996; Novack et al, 2002). Algunos estudios neuropatológicos han establecido una relación entre la epilepsia y una especie de “duplicación” de la capa de células granulares del GD (Mouritzen – Dam et al, 1992).

La lesión del HC ventral se ha propuesto como modelo experimental de esquizofrenia (Chamber et al, 2010) y se ha tratado de establecer correlación clínico patológica entre la psicosis y las diferentes estructuras del HC: pérdida de neuronas (Falkai et al, 1988), heterotopias (Arnold et al, 1991) o alteraciones en las conexiones (Gogtay et al, 2008).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Establecer una cronología de la formación del hipocampo humano durante el desarrollo fetal, analizando los procesos ontogénicos de las células principales del giro dentado y el asta de Amón y la relación entre el hipocampo, el plexo coroideo y el sistema del cortical hem (hem dorsal y hem ventral).
2. Describir los procesos que intervienen en el desarrollo diferencial entre hipocampo dorsal y ventral, centrándonos en la evolución y las características de la unión entre hipocampo dorsal e hipocampo ventral
3. Describir el proceso que conlleva la desaparición del hipocampo dorsal en humanos, una de las grandes diferencias con el hipocampo murino.
4. Estudiar las características morfológicas y la distribución topográfica de las matrices de crecimiento y migración del giro dentado dorsal y ventral en el desarrollo humano, correlacionándolas con lo descrito en modelos animales.
5. Estudiar las diferencias morfológicas a lo largo del eje longitudinal del hipocampo humano en desarrollo, en particular de la eminencia uncal y la *fasciola cinerea*.
6. Estudiar los procesos que intervienen en la formación de la fisura del hipocampo, con especial atención a las células de Cajal Retzius y la proteína p73, correlacionándolos con el desarrollo diferencial del hipocampo dorsal y ventral humano.
7. Describir la malformación del hipocampo (giro dentado y el asta de Amón) del ratón mutante p73 -/- y el efecto de la ausencia de las células de Cajal Retzius y la fisura del hipocampo.

8. Estudiar la conformación tridimensional de hipocampo dorsal y ventral en ausencia de fisura del hipocampo.
9. Analizar las repercusiones funcionales de la ausencia de fisura del hipocampo mediante estudios conductuales en el ratón p73 -/- adulto.

MATERIAL Y MÉTODOS

I) MATERIAL

I. 1 Material humano.

Este trabajo comprende el análisis de veinte cerebros fetales humanos de diferentes edades. Los cerebros fueron obtenidos gracias a la colaboración del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Canarias (HUC), producto de abortos espontáneos atendidos en el HUC. Se descartaron todos aquellos cerebros que no reunían las condiciones de fijación adecuadas, se artefactaron a la manipulación o provenían de interrupciones voluntarias del embarazo por anomalías citogenéticas. La edad gestacional se obtuvo del informe clínico del obstetra y, en los casos en los que el protocolo de autopsia fetal se encontraba disponible (posteriores a 2001), este dato fue contrastado con los valores tabulados para peso, longitud, perímetro craneal, perímetro torácico, perímetro abdominal y longitud del pie (Benson y Doubilet, 1991; O’Rahilly y Muller, 1994; Optiz, 2007). El uso de muestras humanas en este estudio fue previamente autorizado por el comité de Ética del Hospital Universitario de Canarias, en cumplimiento con los requisitos de la declaración de Helsinki y la legislación española (Ley 42/1988 del 28 de Diciembre).

Edad	Peso	Longitud total	Perímetro cefálico	Perímetro abdominal	Perímetro tórax	Pie	Causa de la muerte
9 SG**							Desconocida
10 SG**							Desconocida
11 SG		5,5 cm	5,5 cm	5,3 cm	5,5 cm		Hematoma placenta
12 SG	17,5 gramos	9 cm	7,5 cm	4,5 cm	4 cm	1 cm	Corioamnionitis
13 SG **							Desconocida
13 SG**							Desconocida
13 SG	24 gramos	10 cm	7,5 cm	4,8 cm	6,5 cm	1,1 cm	Anoxia intrauterina
14 SG	33,4 gramos	16 cm	9,5 cm	5 cm	5,5 cm	1 cm	Desconocida
15 SG*	29,6 gramos	8,8 cm	7,1 cm	5,8 cm	6,5 cm	1,1 cm	Anoxia intrauterina
16 SG	60 gramos	13,5 cm	10,3 cm	5,7 cm	7,3 cm	1,6 cm	Corioamnionitis
17,5 SG	165 gramos	22 cm	15 cm	11 cm	14,5 cm		Anoxia intrauterina
18 SG	205 gramos	23,2 cm	14,5 cm	12,5 cm	13,5 cm		Exitus intrauterino
21 SG	360 gramos	22,5 cm	19 cm	13 cm	16 cm	3,5 cm	Corioamnionitis
21 SG	361 gramos	26,2 cm	18,5 cm	13,5 cm	16,5 cm	3,3 cm	Desconocida
21 SG	339 gramos	25,8 cm	17 cm	14 cm	15,5 cm	3,2 cm	Corioamnionitis
24 SG	389 gramos	28,5 cm	22 cm	20 cm	19 cm	4 cm	Anoxia intrauterina
25 SG	490 gramos	35 cm	22,7 cm	20 cm	20,2 cm	4,7 cm	Sepsis
27 SG	812 gramos	39,2 cm	24,3 cm	15,2 cm	17,5 cm	4,2 cm	Infartos placentarios
36 SG	2500 gramos	45,2 cm	29,5 cm				Infartos placentarios

Tabla 5 (página anterior): Relación de muestras utilizadas. Además, como apoyo a nuestras conclusiones, se han utilizado los datos derivados del estudio del cerebro de un recién nacido a término.

I. 2. Material murino.

En esta sección del trabajo nos centramos en el análisis de la estructura del HC del ratón mutante adulto, para lo cual se utilizaron preparaciones histológicas provenientes de los cerebros de 41 ratones mutantes y sus respectivos controles (usando como controles a hermanos de la misma camada y del mismo sexo) de 3 meses (3), 4 meses (3), 6 meses (2), 7 meses (2), 8 meses (3), 9 meses (4), 10 meses (3), 11 meses (1), 12 meses (4), 13 meses (3), 14 meses (5), 15 meses (2), 17 meses (2), 19 meses (1) y 25 meses (2). En los casos en los que consideramos que su estudio nos serviría de apoyo para la comprensión del material adulto, recurrimos a material previamente preparado en nuestro laboratorio de embriones de 12 días, 14 días y 14,5 días, así como animales recién nacidos y adultos con genotipos mutantes para TAp73, DeltaNp73, p73 y salvaje, proporcionados por los laboratorios de Bruselas (André Goffinet) y Nueva York (Ute Moll).

II) MÉTODOS

II. 1 Tallado y selección de secciones.

El material de edades inferiores a 21 SG fue procesado en su totalidad, eligiéndose muestras completas para orientar bien coronalmente o bien sagitalmente. A partir de las 21 SG es necesario seleccionar el material a estudiar. Para esto se separan ambos hemisferios, en uno de ellos se realizan cortes cuadrangulares que incluyen el área a estudio, tal y como se muestra en la figura 20.

El hemisferio contralateral se separa en bloque por lóbulos. Estos bloques se incluyen en bloques de tal manera que produzcan secciones coronales una vez procesadas.

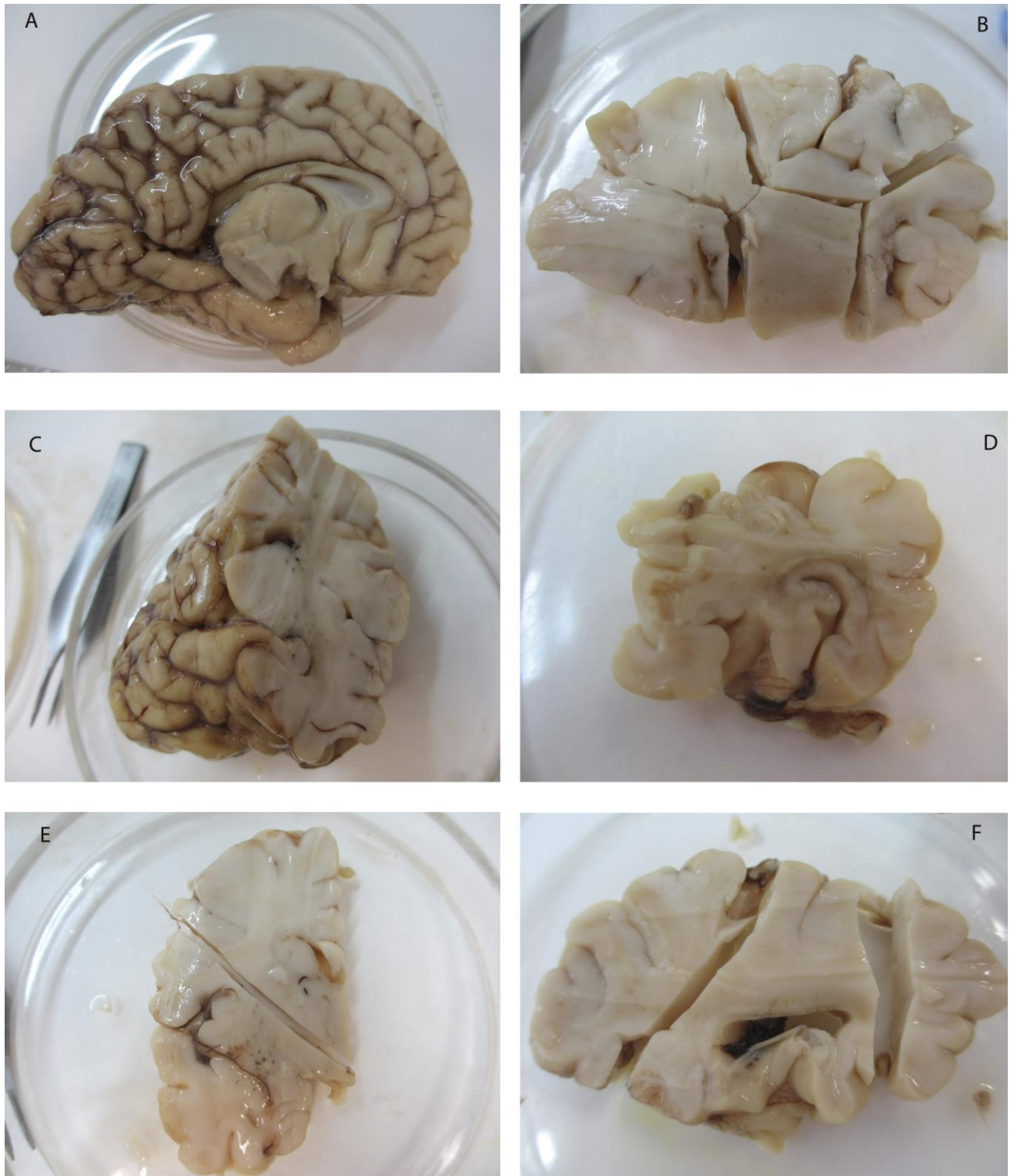


Figura 20: Proceso de tallado del cerebro de un recién nacido a término. A. separación de los hemisferios. B, E, F: selección de secciones sagitales y coronales de áreas especial interés. C, D: confección de bloques por lóbulos.

II. 2. Inclusión en parafina

La inclusión del material, tanto el humano como el murino, se realizó siguiendo un protocolo estandarizado, de tal manera que las muestras fueron procesadas en una escala creciente de alcoholes (70°, 80°, 90°, 96°, 100°), tanto en los casos en los que fueron fijados en el mencionado fijador de Bouin, como en los excepcionales casos en los que fueron fijados en paraformaldehído al 0,5 % en buffer fosfato. Una vez deshidratadas, las muestras se tratan con benzoato de metilo y con benzol. Desde el benzol se cambian en sucesivos lavados de parafina a partir del último de los cuales se confecciona un bloque en el que se orienta la pieza de la forma más conveniente según el sentido del corte deseado. Las muestras fueron cortadas mediante un microtomo Leica en series de secciones de diez micras, utilizándose planos coronales, sagitales y muy excepcionalmente horizontales.

Una vez seleccionadas las secciones de los niveles correspondientes, se someten a desparafinado mediante sesenta minutos a 60° y dos periodos de quince minutos en un baño de xileno. Una vez desparafinadas se rehidratan tratándose con baños de etanol a concentraciones decrecientes (puro, 96°, 90°, 80°, 70°)

II. 3. Inmunohistoquímica:

Para la realización de una correcta tinción inmunohistoquímica es necesario desenmascarar los antígenos cuya detección nos va a permitir realizar la tinción; para ello todas las muestras fueron sometidas a un baño de citrato a pH 5,0-6,0 y T=100° durante 40 minutos. Aquéllas tinciones que se obtienen a partir de un antígeno nuclear requieren un tratamiento más agresivo y se tratan con una solución de tripsina al 12,5 % en Tris salino a pH 7,4-7,6 (TBS: Tri-Sodio citrato 0,6% y NaCl 0,9 %) durante cinco minutos.

Una vez se lleva a cabo el desenmascaramiento del antígeno, las muestras son incubadas con soluciones de anticuerpos primarios obtenidos de suero de ratón o conejo durante 24 horas, después de haber retirado los remanentes de las anteriores soluciones con varios lavados de Tris salino. A continuación se indican los anticuerpos empleados

Antígeno	Concentración	Animal	Tipo	Referencia
<i>P73 alfa</i>	1/300	Conejo	Monoclonal	Kaghad, 1997
<i>Reelin (142)</i>	1/250 en BSA (3-7%)	Ratón	Monoclonal	De Bergeyck, 1998
<i>Tbr1</i>	1/200	Conejo	Policlonal	Hevner, 2001
<i>Calretinina</i>	1/1700	Conejo	Policlonal	Swant®
<i>Calbindina</i>	1/3600	Conejo	Policlonal	Swant®
<i>Parvalbúmina</i>	1/2000	Conejo	Policlonal	Swant®
<i>GFAP</i>	1/250	Ratón	Monoclonal	Abcam®

Tabla 6: relación de los principales anticuerpos empleados.

Tras la incubación a lo largo de un mínimo de 12 horas en una cámara húmeda, los anticuerpos son lavados mediante tres baños de cinco minutos en TRIS buffer salino e incubados en una solución de anticuerpos contra la fracción constante de inmunoglobulinas de ratón y conejo conjugadas con biotina en TRIS (10+10 µl/1500 µl) durante 60 minutos. Después de una última serie de lavados, se incubaron otros 60 minutos en una solución de Streptavidina y Biotina peroxidasa en TRIS (10+10 µl/1500 µl), que actuarían de puente y substrato entre los anticuerpos y los cromóforos. La solución de revelado se prepara en 100 ml de TRIS a los que se añaden 50 mgr de Amonio de Níquel (III) y 50 mgr de Diaminobencidina que sirven como cromóforos. Para inducir la reacción se añade 0,1 ml de una solución de peróxido de hidrógeno al 10%. La reacción se controla bajo microscopio.

Una vez finalizada la reacción, las muestras son lavadas en agua varias veces y deshidratadas con una serie de lavados en alcohol etílico de concentración creciente y dos lavados largo en Xileno (15 minutos) para poder cubrirlas con un cubreobjetos impregnado en Eukitt.

II. 4. Tinción histológica.

Para la tinción histológica se usó Violeta de Cresilo (Nissl), previamente preparada como una solución de 1 g/l de Acetato de cresilo en cristales y 2,5 g/l de acetato glacial 100%, calentada hasta 60 grados el tiempo necesario para que el cristal se funda y antes de cada uso durante 30 minutos. Las muestras destinadas a ser teñidas con violeta fueron desparafinadas siguiendo el método antes descrito y llevadas hasta alcohol de 100°, 96°, y 90° en baño sucesivos, antes de someterse a un baño de Violeta de Cresilo precalentado durante 30 segundos a dos baños de 5 segundos en una mezcla de Ácido Acético y alcohol de 96°. Posteriormente fueron deshidratados con alcoholes de concentración creciente y cubiertos de la manera que ya se ha descrito. Para la tinción de Klüver Barrera se tiñó con Luxol al 0,1% y, después de diferenciar con alcohol al 100% y al 75% y con carbonato de litio al 0,05%. Finalmente se utilizó violeta de cresilo como contratinción.

II. 5. Inmunofluorescencia.

En muy escasas ocasiones se ha recurrido a la inmunofluorescencia para la obtención de imágenes. El proceso de selección y rehidratación del material es análogo al que se realiza en la inmunohistoquímica, incluido el desenmascaramiento del antígeno mediante procesamiento con citrato y tripsina. Una vez realizado el proceso las muestras son incubadas en una solución de bloqueo que permite minimizar la señal de fondo (TRIS buffer salino, BSA 1 mg/ml, NGS al 10% y Tritón 0,1%. Una vez sometido a bloqueo, las muestras fueron incubadas con una mezcla de anticuerpos primarios extraídos de suero de distintos animales, a temperatura ambiente y en cámara húmeda durante 16 horas. Tras la incubación de los anticuerpos primarios las muestras fueron sometidas a numerosos lavados en tampón TRIS buffer salino y reincubadas durante 90 minutos con una mezcla de anticuerpos secundarios similar a la anteriormente descrita, 1 +1/150 de anticuerpos biotiniliados contra inmunoglobulinas de ratón o conejo, estando además el anticuerpo contra inmunoglobulinas de conejo

acoplado a cyanina 3 (Cy3). En el último paso se añade la streptavidina unida a fluorocromo Cy5 de Amersham y se incuba durante 90 minutos en una cámara oscura. Por último las muestras se lavan intensamente en soluciones de Tris Buffer Salino y cubiertas con una solución 1:1 de Glicerol/TBS Triton y DABCO de 10 % (1,4 diazobis(2,2) octano) que protege las muestras de la fotooxidación. En aquellos casos en los que se consideró necesario, se omitió el paso por los anticuerpos primarios (en su lugar se incubaron durante 16 horas en Tris Buffer salino) de alguna de las secciones para disponer de un control negativo. Los núcleos fueron detectados, en las secciones concretas que se consideró necesario, con DAPI. Las imágenes de inmunofluorescencia fueron obtenidas utilizando un microscopio confocal FluoView 1000 (Olympus Optical, Barcelona).

II. 6. Reconstrucciones tridimensionales.

Las reconstrucciones tridimensionales las consideramos parte integrante de la exposición de resultados y son necesarias para la comprensión de un proceso dinámico tan complejo como el desarrollo del sistema nervioso central humano. Se construyeron a partir de secciones sagitales de diez micras teñidas con Nissl. Se seleccionaron para tinción de forma aleatoria y sistemática una de cada cinco secciones, es decir, que obtenemos muestras teñidas cada cincuenta micras. De esta manera se asegura la proporcionalidad en la recreación. Una vez teñidas fueron fotografiadas con un fotomicroscopio mediante el programa Axio Cam 15.0. Desde el fotomicroscopio fueron importadas con una ampliación de 2,5 aumentos a un software de dibujo (Micro Station VX 8) donde se contornearon las capas principales de GD y asta de Amón sección a sección. Una vez dibujados los contornos fueron importados al programa Auto Cad 2014, organizados en sentido medial a lateral y unificados entre sí mediante el uso de la herramienta de elevación: la elevación es la construcción de un sólido en 3D a partir de un objeto curvo en 2D que sirve de sección transversal (figura 21, fuente: www.autodesk.es/education).

Este proceso se repitió con cada pareja de secciones hasta obtener un modelo tridimensional.

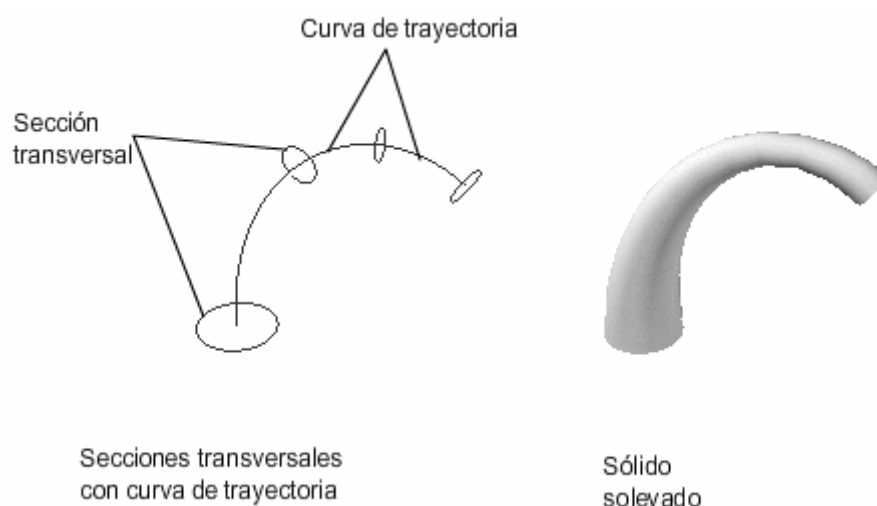


Figura 21. Concepto de solevación.

Es importante señalar que las reconstrucciones se han realizado con el objetivo de comprender y mostrar la relación entre el GD y el asta de Amón, tomando como sección transversal el perfil de sus capas principales teñidas con Nissl o anticuerpos específicos (ver resultados).

En las muestras murinas, que implican un mayor número de secciones y son más sencillas de seriar, las reconstrucciones se han realizado a partir de secciones sagitales de diez micras teñidas con Nissl. Se seleccionó para tinción de forma aleatoria y sistemática una de cada cinco secciones, es decir, que obtenemos muestras teñidas cada cincuenta micras. De esta manera se asegura la proporcionalidad en la recreación. Una vez teñidas fueron fotografiadas con un fotomicroscopio mediante el programa Axio Cam 15.0. Desde el fotomicroscopio fueron importadas con una ampliación de 2,5 aumentos a un software de dibujo (Micro Station VX 8) donde se contornearon las capas principales del GD y asta de Amón sección a sección. Una vez dibujados los contornos fueron importados al programa Sketch Up 8.0, organizados en sentido medial a lateral y unificados entre sí mediante la construcción de planos triangulares entre cada contorno. Este proceso se repitió con cada pareja de secciones hasta obtener un modelo tridimensional.

II. 7. Métodos de crianza y selección de los modelos animales.

Los ratones mutantes proceden del cruce de ratones heterocigóticos criados a partir de las cepas C57BL/6 y 129/Sv Jea y genotipados por PCR. Fueron sacrificados bajo anestesia y siguiendo los protocolos del Comité Ético de la Universidad de La Laguna y el Estabulario Central de dicha universidad. Los ratones mutantes, estériles, se identifican al cabo de la primera semana postnatal dado su retraso en el crecimiento y se confirma su genotipo mediante PCR. Dado que los ratones p73 $-/-$ no son capaces de competir con sus hermanos por la lactancia materna, nuestro grupo desarrolló un protocolo intensivo de cuidados para evitar que el retraso en el crecimiento acabara por conducir a la muerte por malnutrición. A los ratones a los que se les sospechaba un genotipo mutante se les separaba del resto de la camada y se les criaba mediante hembras nodriza que permitían al ratón acceso a la lactancia ad libitum durante las primeras dos a seis semanas del desarrollo (Medina-Bolívar et al, 2014). Este protocolo permitió que la supervivencia perinatal de estos animales pasara de aproximadamente un 9% hasta un 49% (figura 22).

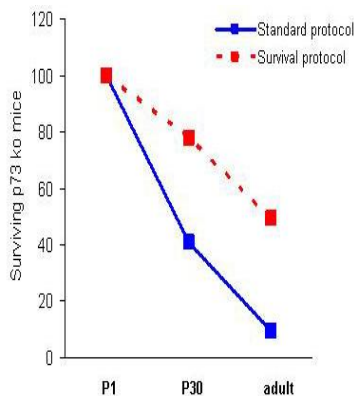


Figura 22: Supervivencia de los ratones mutantes. Tomado de Medina Bolívar et al, 2014.

Después de ser anestesiados, los animales fueron perfundidos por vía transventricular con fijador de Bouin y sus cerebros extraídos e incluidos en parafina.

II. 8. Genotipado del material murino.

II.8. A EXTRACCIÓN DEL ADN

Se ha extraído material genético a partir del extremo distal de la cola de los ratones de 1 mes de edad, siguiendo una modificación del protocolo de Laird (1991). El extremo distal de la cola se incubó durante una noche en tampón de lisis, compuesto por:

- ☐ 100mM de TRS HCl (pH 8,5)
- ☐ 5mM de EDTA (pH 8)
- ☐ 200mM de NaCl
- ☐ SDS al 0,2 %
- ☐ Proteínasa K a 100 microgramos/ml

La incubación dura 16-24 horas y se produce a 55 °C. Después se centrifuga el producto a 14000 rpm durante diez minutos y se extrae el sobrenadante, que se mezcla con igual volumen de Isopropanol y se vuelve a centrifugar a 14000 rpm durante diez minutos. Del segundo centrifugado se extrae el pellet, que se resuspende en un tampón compuesto por:

- ☐ 10mM de TRIS
- ☐ 1mM de EDTA

II.8. B. REACCIÓN DE LA POLIMERASA.

El extracto se divide en alícuotas de 1 microlitro.

Los cebadores fueron sintetizados en el laboratorio de Meredith Irwin (Toronto), que proporcionó dos cebadores “sentido”, uno para el alelo salvaje y otro para el alelo mutado, y un cebador “contrasentido” válido para ambos.

Cebador 1 (Exón 5)

GGGCCATGCCTGTCTACAAGAA

Cebador 2 (mutante)

GAAAGCGAAGGAGCAAAGCT

Cebador 3 (exón 6, contrasentido)

CCTCTACACGGATGAGGTG

Esto generaba un producto global de 600 pares de bases (Wt) a 450 pares de bases (knockout).

Estos cebadores se destinan al proceso de amplificación, que se realiza sobre un volumen de reacción de 25 microlitros y se compone de:

- ☐ Tampón de Reacción (670 mM de TRIS HCl a pH 8,8, 160 mM de sulfato de amonio y 0,1% de Tween2D).
- ☐ 2,5mM de cloruro de magnesio.
- ☐ 0,5 micromolar de cada cebador.
- ☐ 66,7 micromolar de una mezcla de deoxinucleótidos trifosfato (dNTP).
- ☐ 1 microgramo de DNA.
- ☐ 1 UI/reacción de polimerasa EcoTaq.

Y agua MiliQ hasta completar el volumen de reacción.

La reacción en cadena se llevó a cabo en un termociclador GenaAmp PCR System 9700 que lleva a cabo un programa consistente en la desnaturalización del DNA durante 3 minutos a 94 grados y treinta ciclos de amplificación:

- ☐ 1 minuto a 94 grados
- ☐ 1,5 minutos a 60 grados
- ☐ 2 minutos a 72 grados

Y finalmente un ciclo de elongación de 5 minutos a 72 grados

II.8. B. ELECTROFORESIS.

Los productos de amplificación se resuelven mediante electroforesis en gel de Agar al 1% en TBE (10% TRIS, 5% Ácido bórico y 4% EDTA) teñido con Bromuro de Etidio (1 ng/ml). Para cada muestra se usan 10 microlitros de cada reacción que se migran en el gel tras añadir el tampón de carga (50% glicerol, 24% de azul de bromofenol, 2% de EDTA disueltos en agua MiliQ autoclavada). El gel se moviliza a voltaje constante de 100 mV y la visualización de este se realiza mediante el sistema Gel Logia 100.

II. 9. Valoración de la integridad funcional del hipocampo (Aprendizaje condicionado).

Una de las funciones mejor establecidas del HC es la adquisición del conocimiento, por lo que consideramos necesario el análisis de la repercusión del genotipo en esta función. Una de las pruebas conductuales clásicas para estudiar el aprendizaje condicionado es el *Shuttle Box*, un dispositivo que juega con el condicionamiento skinneriano y que también se conoce con el nombre de “*passive avoidance test*”. Este consiste en un recipiente cerrado con dos cámaras intercomunicadas por una puerta abierta. A intervalos fijos de 40 segundos, un pulso de luz y sonido de 10 segundos precede a una descarga eléctrica de 10 segundos de duración, que se produce solamente en la cámara que ocupa el animal en el momento del inicio del pulso. Si el animal cambia de cámara al escuchar el pulso, el ciclo se reinicia y no se produce descarga y de esta manera los animales pueden evitar el estímulo aversivo mediante una respuesta condicionada. Este tipo de protocolo se ha utilizado frecuentemente para valorar la integridad funcional del CA (Zamani et al, 2013). Se realizaron cuarenta ciclos durante cuatro días y se evaluó la curva de progresión de los animales, cuantificando el número de respuestas sobre el total de ciclos. Los resultados se analizaron con Microsoft Excel XP.

RESULTADOS

I) EL DESARROLLO DEL HIPOCAMPO HUMANO

I. 1. Feto de Nueve Semanas de Gestación (9SG): estadio de cortical hem.

En esta edad la corteza cerebral está aún muy inmadura; puede observarse la existencia de una placa pionera (Meyer et al, 2000) con tinciones inmunohistoquímicas para Tbr1 y CR (Figura 23). Las eminencias ganglionares comienzan a diferenciarse, siendo el putamen el primero en ser detectable morfológicamente. Se observa un primordio de cápsula interna, como una masa de sustancia blanca que penetra de lateral a medial en la futura corteza, aislando al futuro putamen del futuro caudado. Al inicio del período fetal (8-9 SG) sigue existiendo el cortical hem (Grove et al, 1998; Meyer et al 2010) como centro de señalización cortical, continuado en sentido dorsal y ventral posterior con la futura corteza, en cuya zona ventricular se observa proliferación celular, identificable en inmunotinciones para PCNA. No obstante, en los extremos más mediales de la corteza y más cercanos al cortical hem, la estructura de la capa pionera se pierde para transformarse en un área no estratificada con una abundante población de células Tbr1+. De esta manera, en las zonas dorsales y laterales se puede ver una capa densa de células pioneras que no es posible observar en los extremos mediales (figura 25, 2). En las tinciones inmunohistoquímicas con proteínas ligantes del calcio puede observarse una intensa reactividad para CB en el conjunto del cortical hem, así como en los plexos coroideos de los ventrículos laterales, que se continúan con el hem (figura 24). Es posible observar como el cortical hem, que se encuentra a nivel dorsal, se comunica con la raíz del plexo coroideo de los ventrículos laterales y a su vez, a nivel posterior, con una porción ventral del hem que muestra características tintoriales análogas a las descritas (figura 25). Este es el mecanismo por el cuál se distinguen, a partir de este momento, un hem dorsal y ventral, que relacionamos con un futuro HC d e HC v.



Figura 23 (arriba): la placa pionera con Tbr1. Figura 1.1: a, extremo medial de la corteza (placa hipocampal) donde no existe capa de células pioneras. B: células pioneras (ampliado en fig 1.2). C: plexo coroideo. D: ventrículo

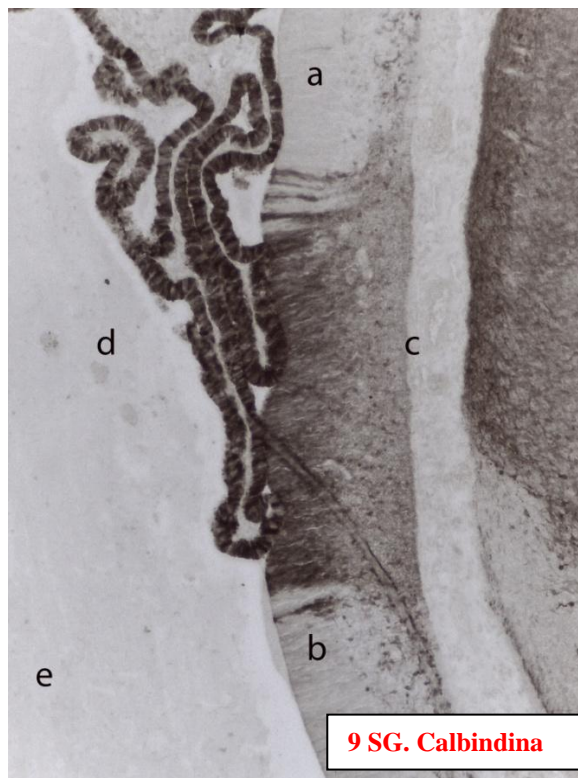


Figura 24 (izquierda): la raíz de los plexos coroideos (d) en niveles posteriores, teñido con Calbindina. En este punto se produce la confluencia del hem dorsal y del hem ventral. Las estructuras adyacentes aún no han generado primordio hipocampal dorsal (a) ni ventral (b). Los plexos coroideos (d) y el hem son CB+. E: ventrículo

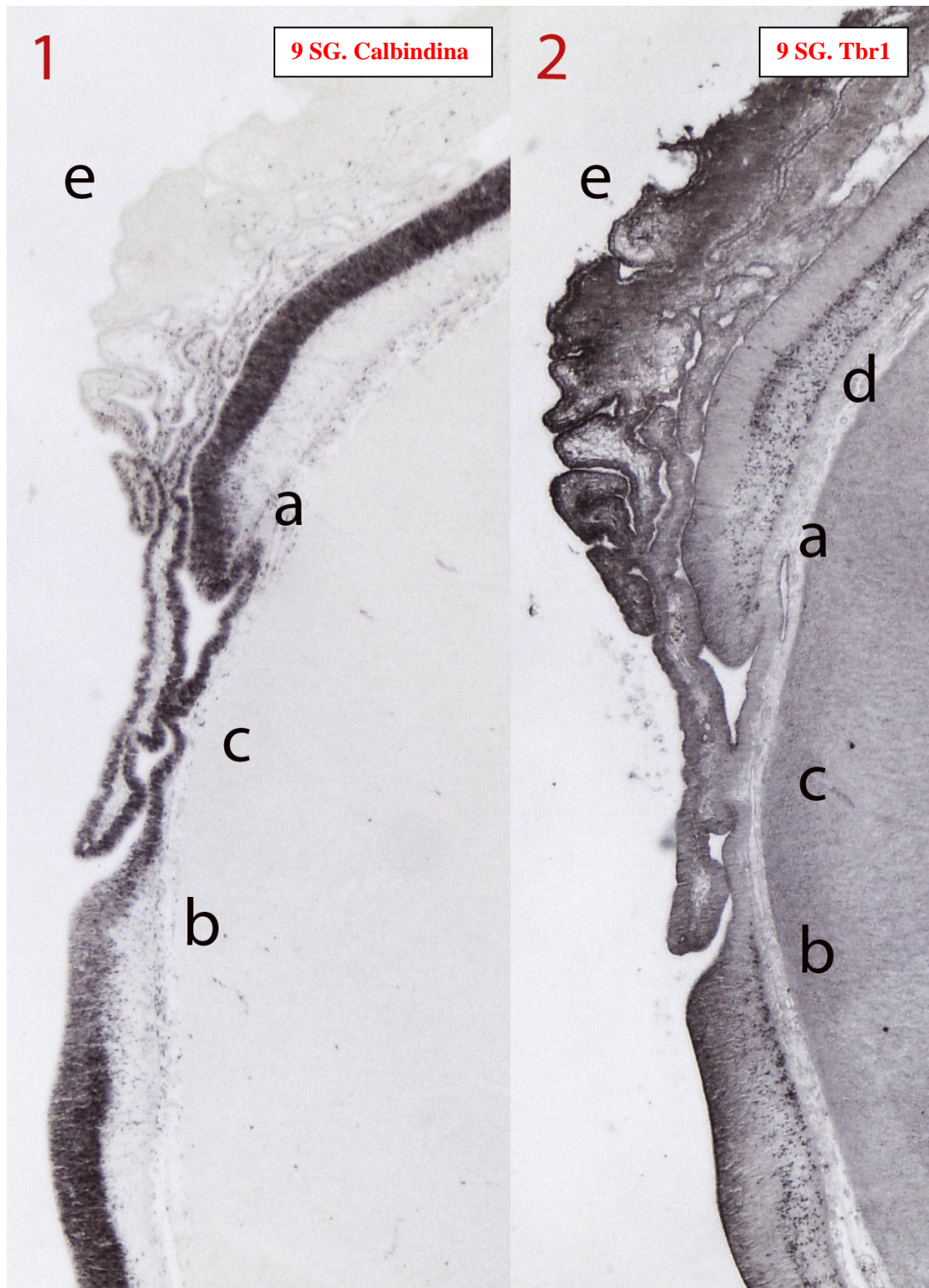
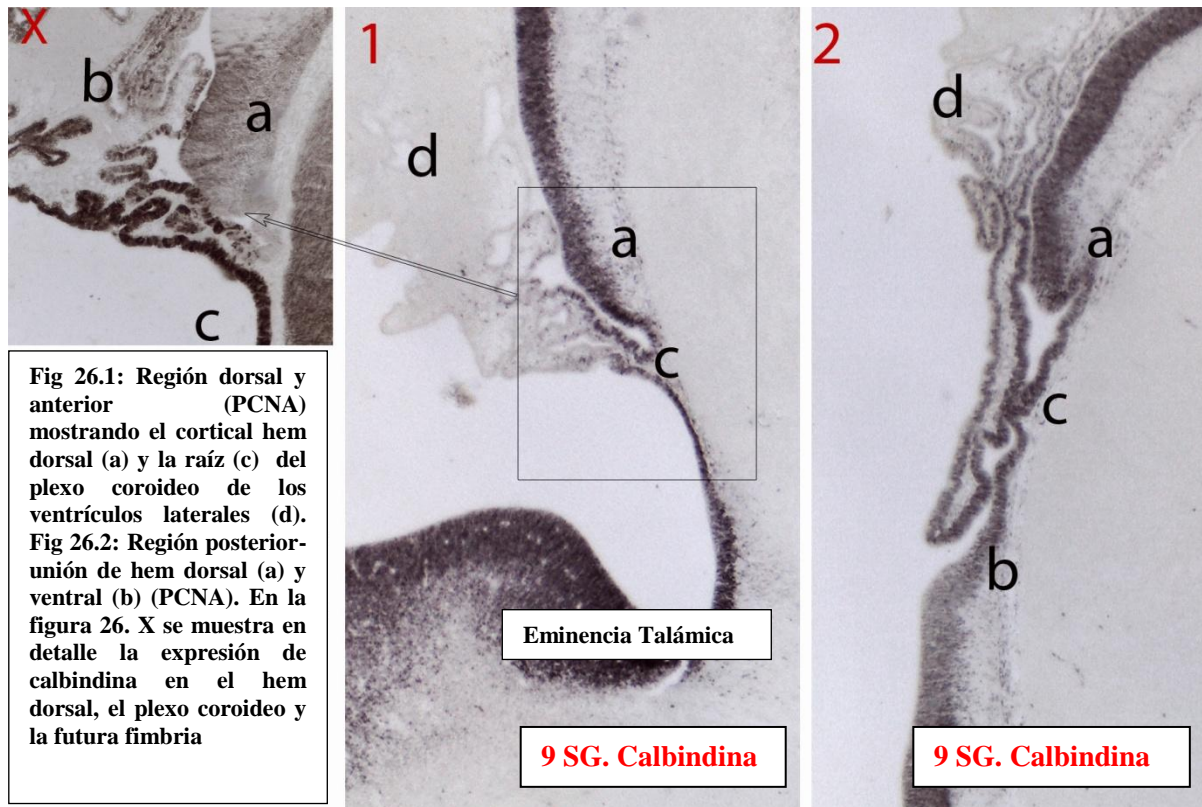


Figura 25: El sistema del hem – plexos coroideos en niveles posteriores teñido con PCNA (25.1) y Tbr 1 (25.2); se aprecia la unión del sistema hem (a) y ventral (b) junto con la raíz del plexo coroideo (c) de los ventrículos laterales (e). Con Tbr1 se aprecia la presencia de la placa pionera, consistente en una condensación de células Tbr1+.



No obstante, siempre es observable la presencia de plexo coroideo, inmunorreactivo para CB, conectando (en secciones intermedias) la eminencia talámica y el cortical hem dorsal (figura 26.1). En lo referente al plexo coroideo, CB y PCNA se expresan en las mismas regiones, que corresponden con la raíz del plexo (figura 26.2 y 26.X). En el polo anterior del telencéfalo, el primordio hipocampal es continuo con el septum, siendo los núcleos septales dorsales intensamente CB+. Esta continuidad con estructuras septales probablemente corresponde a lo que autores clásicos (Stephan, 1975) denominaron HC precomisural. En cambio, las tinciones con CR nos permiten diferenciar los extremos más mediales de la placa pionera, que se advierte como una capa relativamente condensada de células CR+ separadas de la superficie pial por una fina zona marginal. De estas neuronas parten fibras en dirección a la zona intermedia que son fácilmente observables en la base de la placa pionera. En los extremos laterales de la corteza la distribución de la tinción de la placa pionera es notablemente diferente, ya que la placa pionera se ha escindido y permitido la entrada masiva de neuronas de la placa cortical, que no expresan CR. De ambos representantes del CH (a nivel dorsal y a nivel ventral) se observa una corriente de células que expresan CR y CB, pero también p73 y Reelin, y que se corresponden con neuronas de Cajal Rezius originadas en el CH

y que migran tangencialmente a lo largo de la delgada zona marginal de los hemisferios cerebrales.

En la región dorsomedial del palio se aprecia ya desde las nueve semanas una escotadura superficial que progresará a lo largo de las semanas y que constituye la primera marca de la cisura cingular. La región del palio que se encuentra proximal a la cisura cingular con respecto al hem se caracteriza por la aparente desorganización de la misma, llamativa cuando se tiñe con CR. Esta región coincide con las futuras áreas allocorticales, es decir, el futuro HC d. A las 9 SG no es posible encontrar ninguna estructura del futuro HC: todavía no se reconoce placa amónica ni primordio del GD.

I. 2. Feto de 10 semanas de gestación (10SG): Inicio de la formación del Hipocampo dorsal.

El feto de 10 SG representa un estadio de transición entre la edad fetal temprana y las semanas finales del primer trimestre (doce y trece semanas), cuando se producen los principales cambios. De forma general se produce un aumento del tamaño del telencéfalo a expensas de la placa cortical y de un dramático crecimiento en el área de los ventrículos. La zona cortical adyacente al plexo coroideo dorsal comienza a variar notablemente su aspecto morfológico. Este aumento ventricular puede relacionarse con el observado en los plexos coroideos de los ventrículos laterales que se distienden y ramifican hasta ocupar una superficie mucho mayor que en la semana previa. En esta edad la placa cortical se extiende a lo largo de todo el palio, y la placa pionera ha desaparecido casi completamente, siendo visible solamente en el extremo medial.

En esta edad, el cortical hem dorsal ha desaparecido para dar paso a una estructura CB- (figura 27.2) que no posee aún gliopitelio fimbrial ni una placa amónica CB+ (figuras 27.2, 28 y 28.A). Esta estructura de transición coincide con el cortical hem ventral aún funcionante (figura 27.1), al que se encuentra conectado mediante una lámina de tejido coroideo (lámina de conexión, ver más adelante y en la figura 28.A). En su superficie este antecesor del HC d presenta una profunda escotadura PCNA+ (figura 28.B).

Esta escotadura probablemente se corresponde con el *dentate notch* de Bayer y Altman (1990). Desde el ápice de la fimbria (su extremo medial) se extiende una fina lámina de tejido que establece conexión con el plexo coroideo y el hem ventral, que en esta edad mantiene un aspecto menos diferenciado que su contraparte dorsal y menor actividad proliferativa (ver Esquema 2). A lo largo de toda esta lámina es posible identificar actividad mitótica. Así, a las diez semanas del desarrollo intrauterino, el primordio del HC d ha sustituido casi completamente al hem dorsal y queda conectado con el hem ventral aún identificable como tal.

En el componente ventral (figura 27), en cambio, no es posible observar esta distribución anatómica; vemos una placa continua que, en su extremo dorsal, se continúa con el futuro glioeptelio fimbrial dorsal y el plexo coroideo.

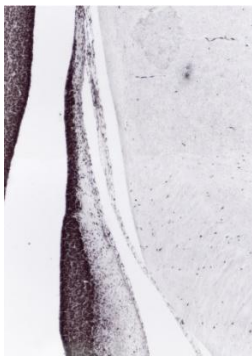


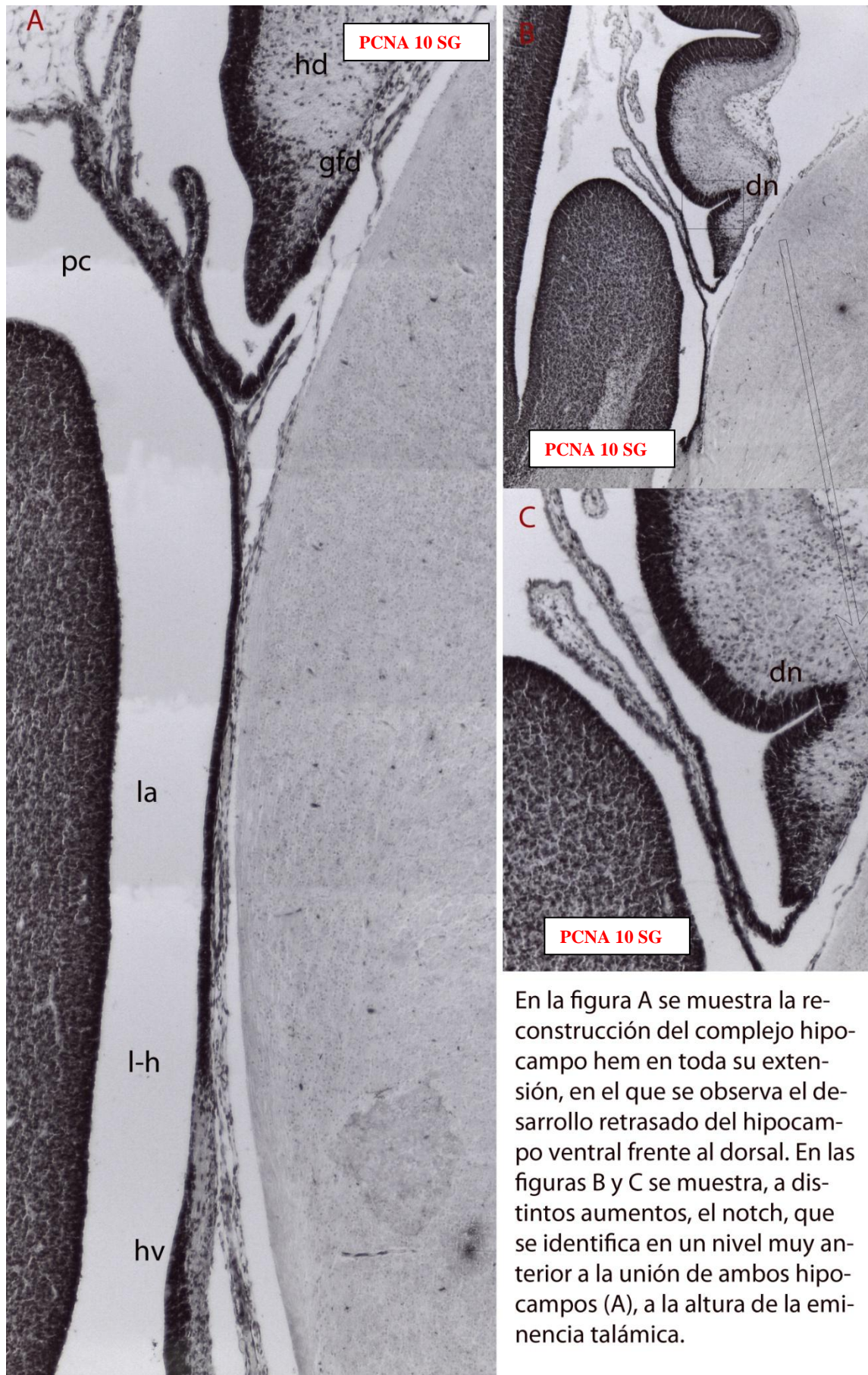
Figura 27.1 (izquierda): Detalle del hem ventral (PCNA)

Figura 28 (página siguiente) (PCNA): Unión de la placa hipocampal dorsal (28.A) con imágenes en detalles de la placa hipocampal dorsal en niveles dorsales anteriores (28B y C). hd: hipocampo dorsal; hv: hem ventral / futuro hipocampo ventral; pc: plexo coroideo; la: lámina de conexión extendiéndose entre hipocampo dorsal y hem ventral; dn: *dentate notch*

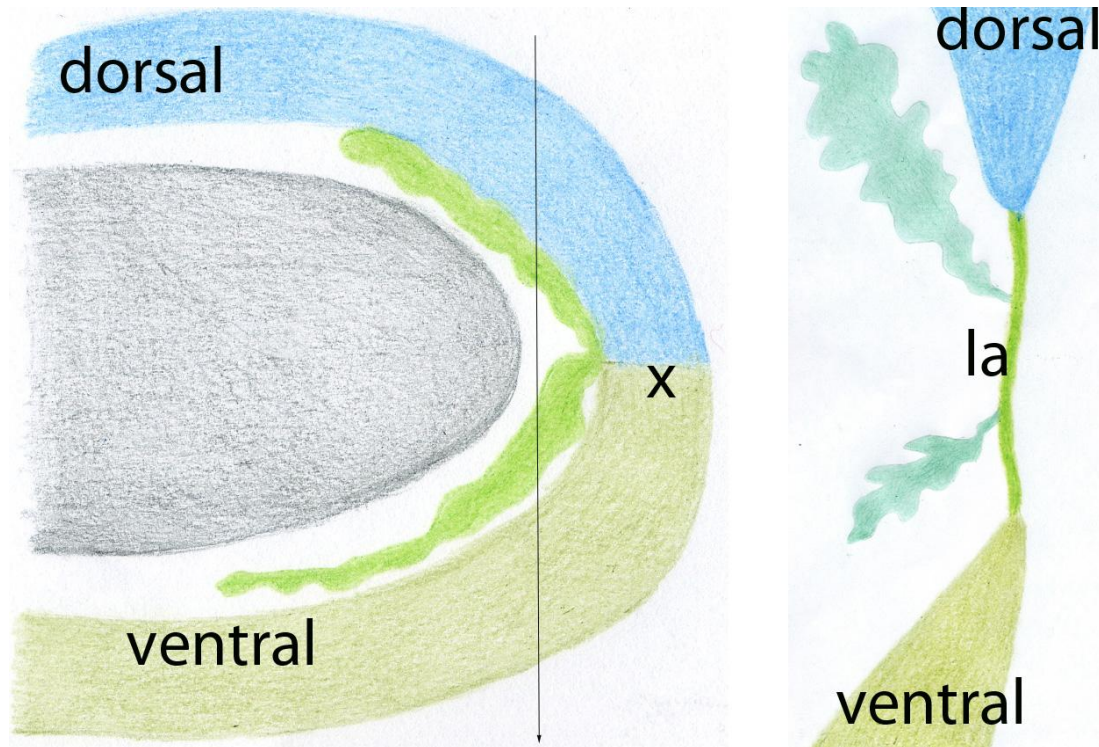


Calbindina 10 SG

Figura 27.2 (izquierda): Detalle del antiguo hem dorsal en el que se observa expresión de CB en el plexo coroideo, pero no existe PA dorsal CB+.



En la figura A se muestra la reconstrucción del complejo hipocampo hem en toda su extensión, en el que se observa el desarrollo retrasado del hipocampo ventral frente al dorsal. En las figuras B y C se muestra, a distintos aumentos, el notch, que se identifica en un nivel muy anterior a la unión de ambos hipocampos (A), a la altura de la eminencia talámica.



Esquema 2. Organización del complejo hem-hipocampo en el feto de 10 SG. (a la izquierda se presenta una vista sagital, a la derecha una vista coronal; la línea vertical señala el nivel de la “sección”). El hem dorsal ha desaparecido y aún no se ha desarrollado la PA. Esta estructura intermedia dorsal convive con un hem ventral funcionando, al que se encuentra conectado mediante una lámina de conexión (la). El componente dorsal y el componente ventral se encuentran unidos en el nivel posterior (x), coincidiendo con la raíz del plexo coroideo.

I. 3. Feto de 12 semanas de gestación (12SG): Aparición de la placa Amónica (PA) y coexistencia de hipocampo dorsal e hipocampo ventral.

Disponemos de tres casos de 12 SG en nuestra colección: Todos muestran artefactos mecánicos que, sin embargo, no impiden una correcta valoración inmunohistoquímica, de gran valor para el desarrollo de nuestro trabajo.

I. 3. A. HIPOCAMPO DORSAL.

En los niveles más anteriores, rostrales a la comisura blanca anterior, se puede observar una placa amónica en contacto con estructuras septales, distinguible como un cúmulo de células inmunorreactivas para CB. La CB es también intensamente positiva en los núcleos septales (figura 30, A y B). No es posible distinguir en estos niveles y en esta edad el GD. En la zona más medial de la corteza, donde debería observarse el GD, existe inmunorreactividad leve para CR, que podría corresponder con células pioneras nacientes o neuronas de Cajal-Retzius. También es posible ver con CR la continuación dorsal de la placa pionera

En niveles más posteriores a la comisura blanca anterior se puede ver una placa amónica con CB que se sitúa dorsalmente al *septum*. En este nivel se observa el polo anterior del plexo coroideo (figuras 29 y 30, C y D). Conforme se avanza en sentido posterior se distingue una placa amónica progresivamente más definida y comienza a aparecer en el polo medial de la corteza una estructura que probablemente corresponde con la futura fimbria (figura 29). La aparición del plexo coroideo coincide con la aparición de la fimbria y la fisura coroidea (Zemmoura et al, 2012).

En los niveles donde se aprecia esta fimbria en formación, en el extremo medial de la placa amónica, se observa un agregado esferoidal de células inmunorreactivas para CR (figuras 29, 30 C y 30,2), que por su localización puede corresponder con el primordio del GD. En niveles más anteriores (rostrales a la aparición del plexo coroideo) no es posible observar estos agregados CR+ en el polo medial de la corteza, lo que sugiere una escasa o nula presencia del GD. Este agregado esferoidal es más evidente en niveles más posteriores (figura 30,2); en niveles más anteriores existen células CR + dispuestas en aparente desorden en la futura ubicación del giro dentado, y se observan

fibras fimbriales inmunorreactivas para CR .Esto podría indicar que las conexiones primordiales de la fimbria proceden del GD y no de la placa amónica.

En conjunto, estos datos sugieren que la primera aparición del GD se produce sólo en los niveles del HC en los que existe conexión con el plexo coroideo. A lo largo de este trabajo, se insistirá en esta idea, aplicable también para la región uncal.

En la cara ventricular de la placa hipocampal se advierte una profunda escotadura (figura 29) que separa la fimbria del GD, equiparable al *dentate notch* descrito en otros mamíferos. Anclada en el ápice de la fimbria se encuentra la tenia del plexo coroideo, que es intensamente inmunorreactivo para CB (figura 30 D).

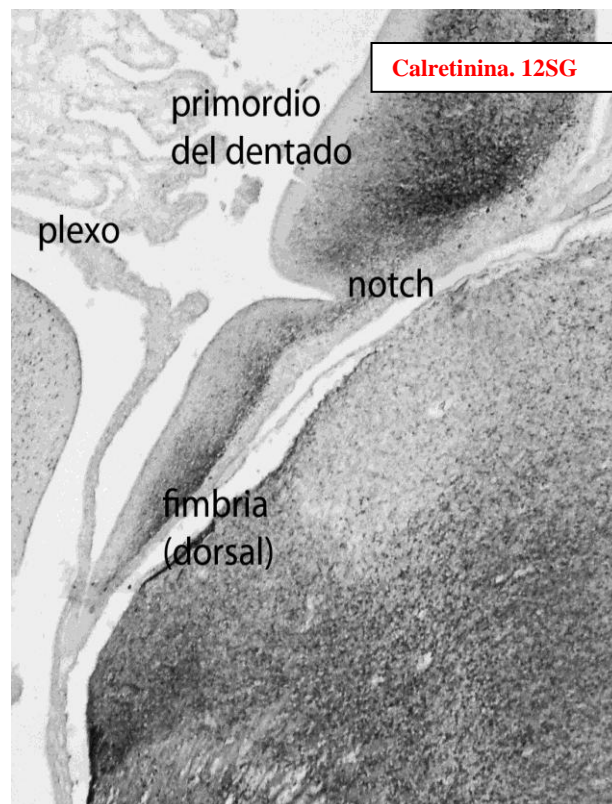


Figura 29 (arriba): el hipocampo dorsal de 12 SG (CR)

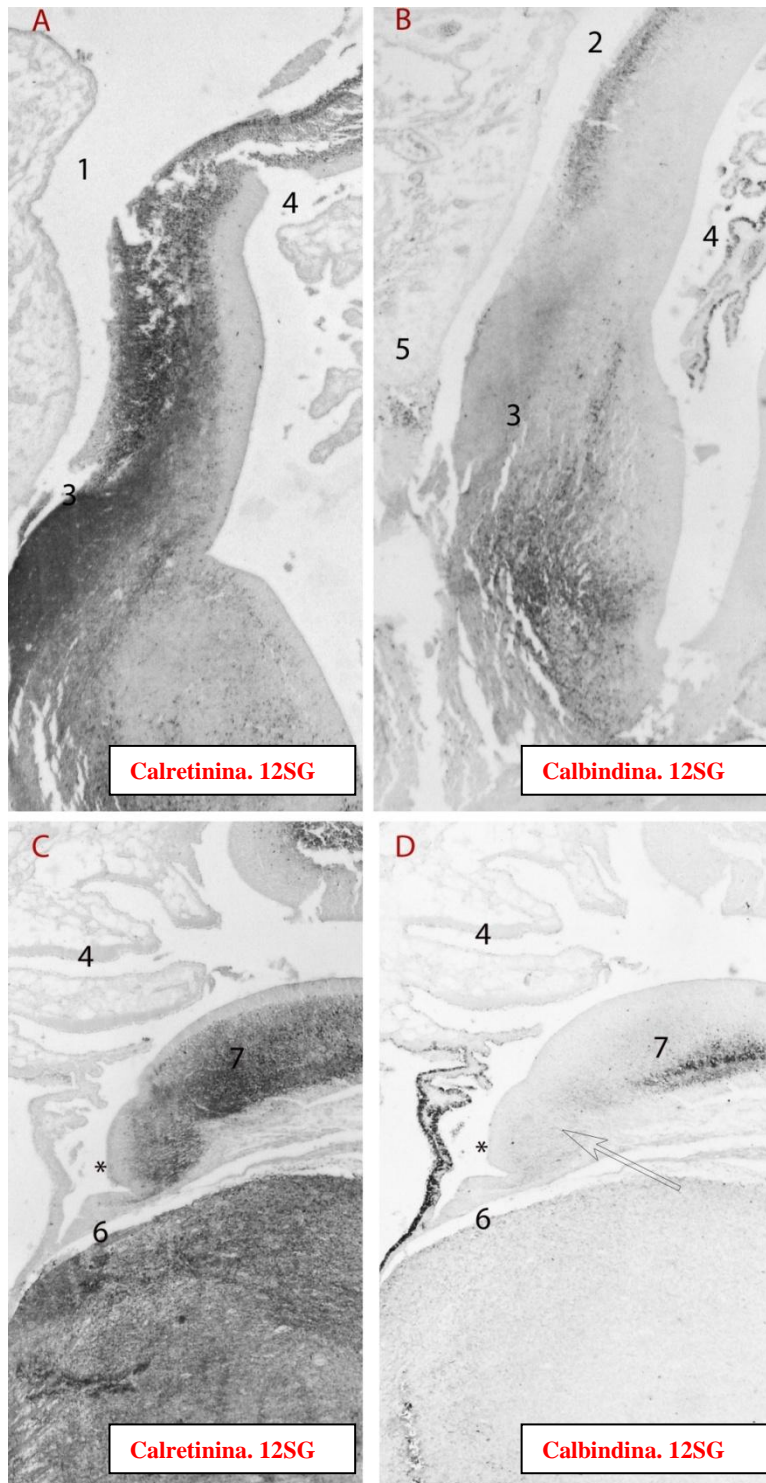


Figura 30 : microfotografías de la continuación del hipocampo dorsal con el septum (30.A; 30.B) y el hipocampo dorsal anterior (30 C; 30 D) con CB (30B; 30D) y CR (30ª; C). 1: cisura interhemiférica; 2: continuación de la placa amónica 3: septum; 4: plexo coroideo; 5: tejido conectivo interhemisférico; 6: fimbria, 7: placa amónica

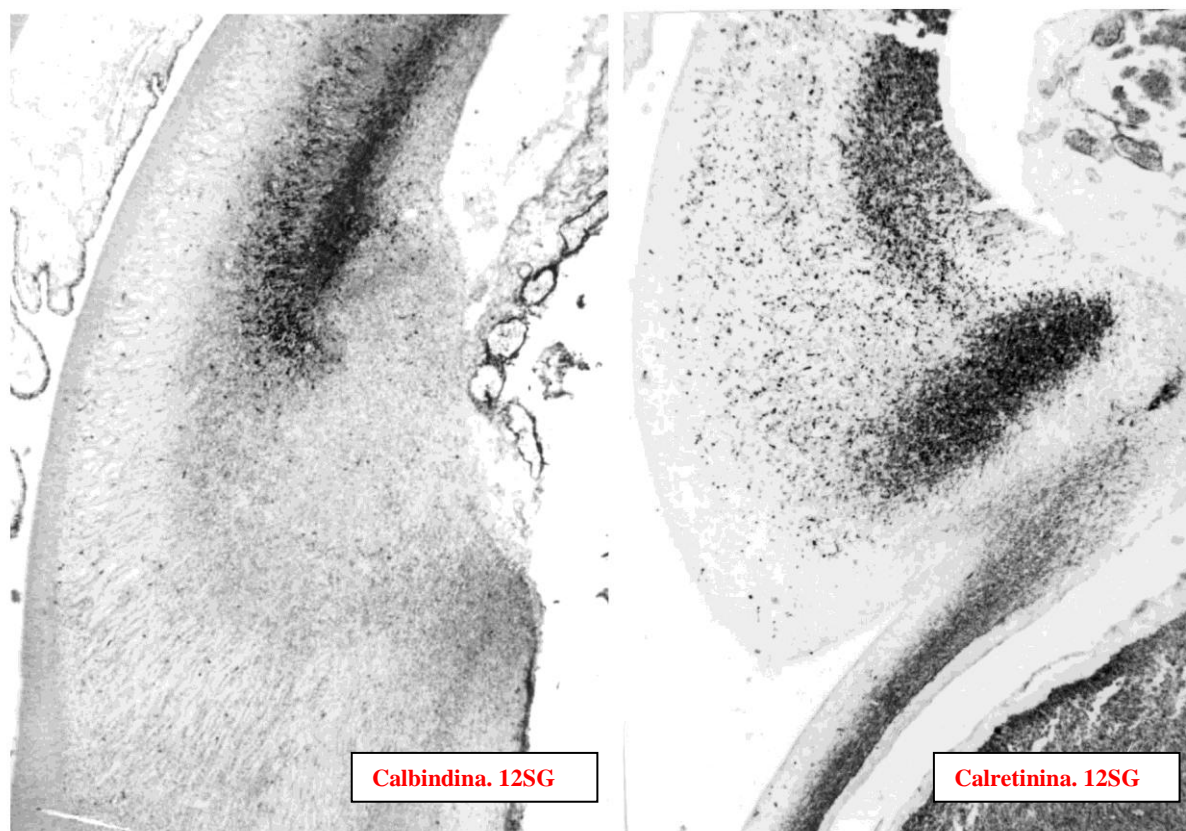


Figura 30, 2 : A la izquierda se observa la PA CB+, mientras que a la derecha se observa el agregado esferoidal CR+ que marca el primordio del GD.

I. 3. B. HIPOCAMPO VENTRAL.

En el HC v, en cambio, la tinción para la placa amónica con CB es mucho más débil y dorsalmente a la misma se detectan células reactivas para CR.

En el extremo anterior de la eminencia uncal, la tinción para CB en la placa amónica es dispersa y muy débil. En los niveles posteriores del HC v es observable una placa amónica mejor definida y un GD primitivo que adopta una forma difusa y vagamente redondeada, fácilmente identificable con CR (figura 31, C). Conforme se avanza en sentido posterior desde el inicio de la descrita eminencia uncal se observa la unión entre HC d e HC v a través de una lámina de tejido proliferativo PCNA + que conecta ambos ápices de las respectivas fimbrias y a su vez las une a las tenias de los plexos coroideos (figura 31, A). Tanto las tenias de los plexos coroideos como esta lámina, que ocupa parcialmente la localización del antiguo cortical hem, muestran positividad intensa para CB (figra 31 A y B).

No hemos encontrado referencias directas en la literatura que nos permitan identificar esta lámina intercoroidea, a la que daremos del nombre de **lámina de conexión** por su posición intermedia entre los plexos coroideos dorsal y ventral.

La fimbria se sitúa en el mismo emplazamiento ocupado en edades fetales anteriores por el cortical hem, y se observa una delgada banda de células de Cajal Retzius CR + que se extienden en su superficie palial medial. En todos los niveles del HC v en los que existe fimbria se identifican acúmulos de células primordiales del dentado CR + inmediatamente adyacentes a la misma que, en estos niveles posteriores, conforman una imagen especular con el HC d.

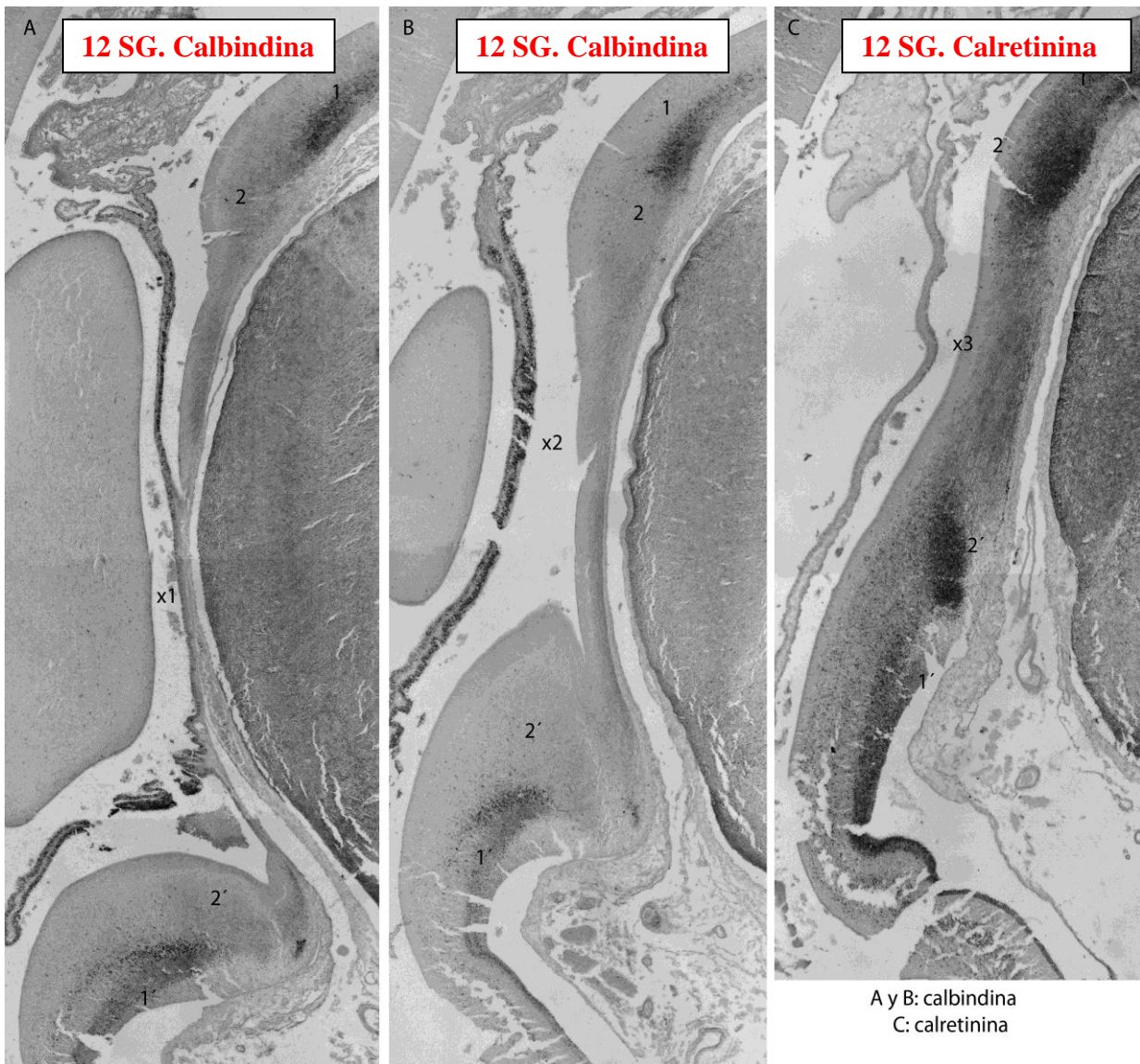


Figura 31: La continuidad de HC d e HC V de anterior (31.A) a posterior (31.C) con CB (31.A y B) y CR (31.C). 1: placa amónica dorsal y ventral (1'). 2: giro dentado dorsal y ventral (2'). Se puede observar la evolución de la unión, en el nivel más anterior la lámina de conexión (x1) comunica HC d e HC v, en niveles más posteriores se observa como entre ambos se extiende la fimbria – fórnix (x3). En la figura 31.B se aprecia la unión entre HC d e HC d en un nivel inmediatamente posterior a la lámina de conexión.

I. 3. C. RECONSTRUCCIONES TRIDIMENSIONALES.

En las reconstrucciones tridimensionales, obtenidas a partir de dibujos de secciones coronales de fetos de 12SG se puede observar como el HC primordial es una estructura alargada con forma de semiesfera con una concavidad anterior. Su extremo anterior se encontraría en contacto con los núcleos septales, mientras que la mencionada concavidad se dispone posterior y lateral al diencéfalo, terminando a nivel de la amígdala (figura 31,2).

El hipocampo de 12 semanas: La cinta azul representa la extensión de la capa de células CB+ (placa amónica y continuación anterior de la misma). La cinta amarilla representa la extensión aproximada de las células pioneras calretinina + y su relación con el asta de Amón.

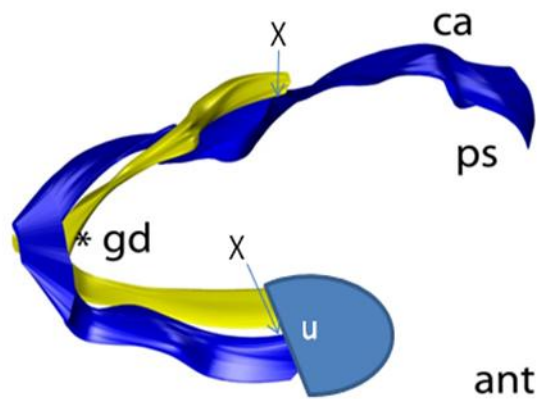


Figura 31.2 (sagital): Reconstrucción de la estructura tridimensional del hipocampo fetal a las 12 SG. Aunque el primordio del GD y la PA no se han desplazado a sus posiciones definitivas, especialmente el polo anterior del primordio del dentado, se puede observar la diferente extensión ántero posterior de estas estructuras. La semiluna (u) representa el futuro polo uncal del hipocampo. Las zonas marcadas con la “x” representan el inicio de la fisura coroidea y, por tanto, del GD. En el polo septal (Ps) se puede apreciar como el primordiodel GD (amarillo) ocupa una longitud anteroposterior muy inferior a la del CA.

I. 4. Feto de 13 semanas: coexistencia de Hipocampo dorsal y ventral. Migración del giro dentado.

El caso de 13 SG representa uno de los ejes del presente estudio, dado que se trata de una edad en la que comienzan a apreciarse características definitivas del cerebro, entre ellas el fórnix y las comisuras.

I. 4. A. HIPOCAMPO DORSAL.

En esta edad se mantiene el mismo inmunofenotipo diferencial que permite identificar diferentes poblaciones celulares del HC. En la zona marginal del HC las neuronas de Cajal Retzius son inmunorreactivas para Reelin, p73 y CR. Se observan focos de inmunorreactividad aislada para CB en la zona marginal inmediatamente suprayacente a la placa amónica, posiblemente también originada en células de Cajal Retzius. El primordio del GD es intensamente inmunorreactivo para CR, mientras que la placa amónica expresa CB (figura 32, D y F).

En los cortes más anteriores se observan los derivados de la primitiva lámina comisural (Hochstetter, 1919), tales como la comisura anterior, la comisura del fórnix y el cuerpo calloso que se sitúan en la región anterior del lóbulo frontal, cerca de la unión del *septum* con la corteza cingular. En niveles rostrales a la comisura anterior es observable un resto de HC, o al menos de placa amónica rostral que no es perceptible en edades posteriores del desarrollo y que coincide en ubicación con el fórnix precomisural (ver figura 35). La placa amónica parece constituir una estructura continua que se extiende desde niveles septales hasta su polo uncal.

En el propio esbozo del cuerpo calloso, que aparece por primera vez en esta edad a partir de la lámina comisural, se puede observar expresión de CR en la superficie, estas células superficiales pueden corresponder con neuronas de Cajal Retzius y se acompañan de una banda en profundidad que muestra expresión de CB y es continua en sentido anteroposterior con el resto de placa amónica descrito en cortes más frontales (figura 35).

En los niveles inmediatamente posteriores a la comisura del cuerpo calloso es visible una fimbria dorsal. La fimbria conecta mediante la tenia de la fimbria con el plexo coroideo, que a su vez se une mediante la tenia terminal a la eminencia talámica y el surco tálamo estriatal. Cabe destacar que el material de 13SG la presencia de un primordio de GD está asociada a la presencia de una fimbria y un plexo coroideo (figura 32).

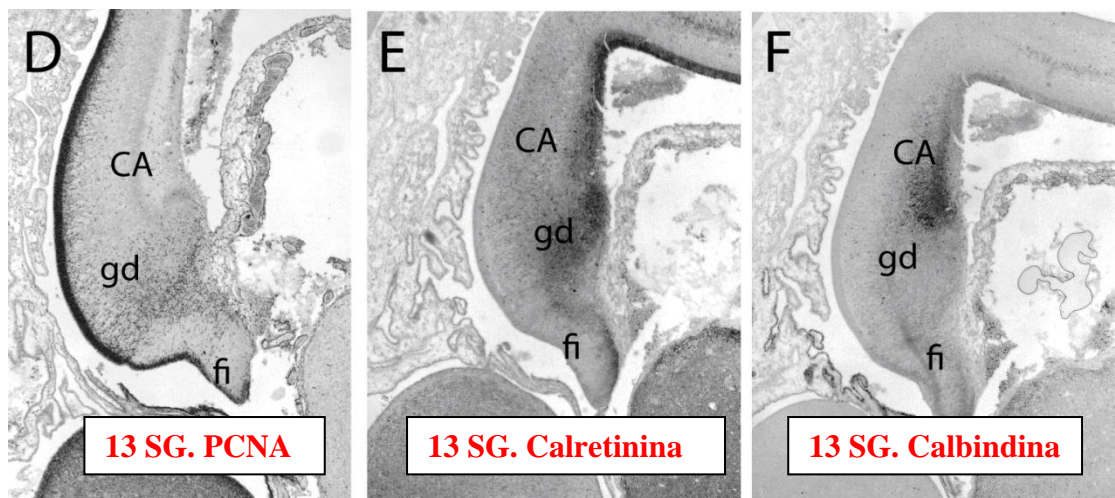


Figura 32: El hipocampo dorsal con PCNA (32.D), CR (32. E) y CB (32.F). CA: asta de Amón; gd: giro dentado; fi: fimbria.

I. 4. B. HIPOCAMPO VENTRAL

En el feto de 13SG se sigue percibiendo al GD como un cúmulo de células inmunorreactivas para CR (figura 33, A). El GD en formación se dispone a modo de banda única en sentido dorso ventral (figura 33, A). De este modo queda la placa amónica separada del primordio del GD por una fisura que, aunque profundiza notablemente, parece mostrar discontinuidades (figura 33, A: flecha). La fisura del HC no comienza a desarrollarse hasta un nivel algo más posterior, donde se advierte una profundización algo mayor de la misma y coincide con un área donde la zona marginal se hace más ancha y está ocupada por neuronas de Cajal Retzius Reelin +. En los niveles más anteriores del HC v, en los que aún no existe GD, se observa un gran ensanchamiento de la placa amónica (ver más adelante). Este ensanchamiento

constituye la *eminencia hipocampal*. En los niveles posteriores del HC v este ensanchamiento desaparece, y la morfología de la placa amónica es análoga a la del HC d. En el presente caso, la fisura del HC parece profundizar en esta eminencia desde niveles posteriores, ya que en el extremo anterior de la misma no es claramente identificable una fisura. Los cortes posteriores al tálamo muestran un gran interés para nosotros dado que es en estos en los que mejor se puede apreciar la unión entre HC d e HC v (figura 33). En esta se puede ver como la fisura separa, frecuentemente de forma casi completa, el GD del asta de Amón. Esta se encuentra revestida en toda su longitud por células que expresan CB, CR y Reelin (figura 34). Estas células que revisten la fisura son neuronas de Cajal Retzius y representa una tercera gran estirpe de células del hipocampo en formación junto con las células CR⁺ del GD y las células CB⁺ de la placa amónica, que comienzan también a mostrar morfología piramidal.

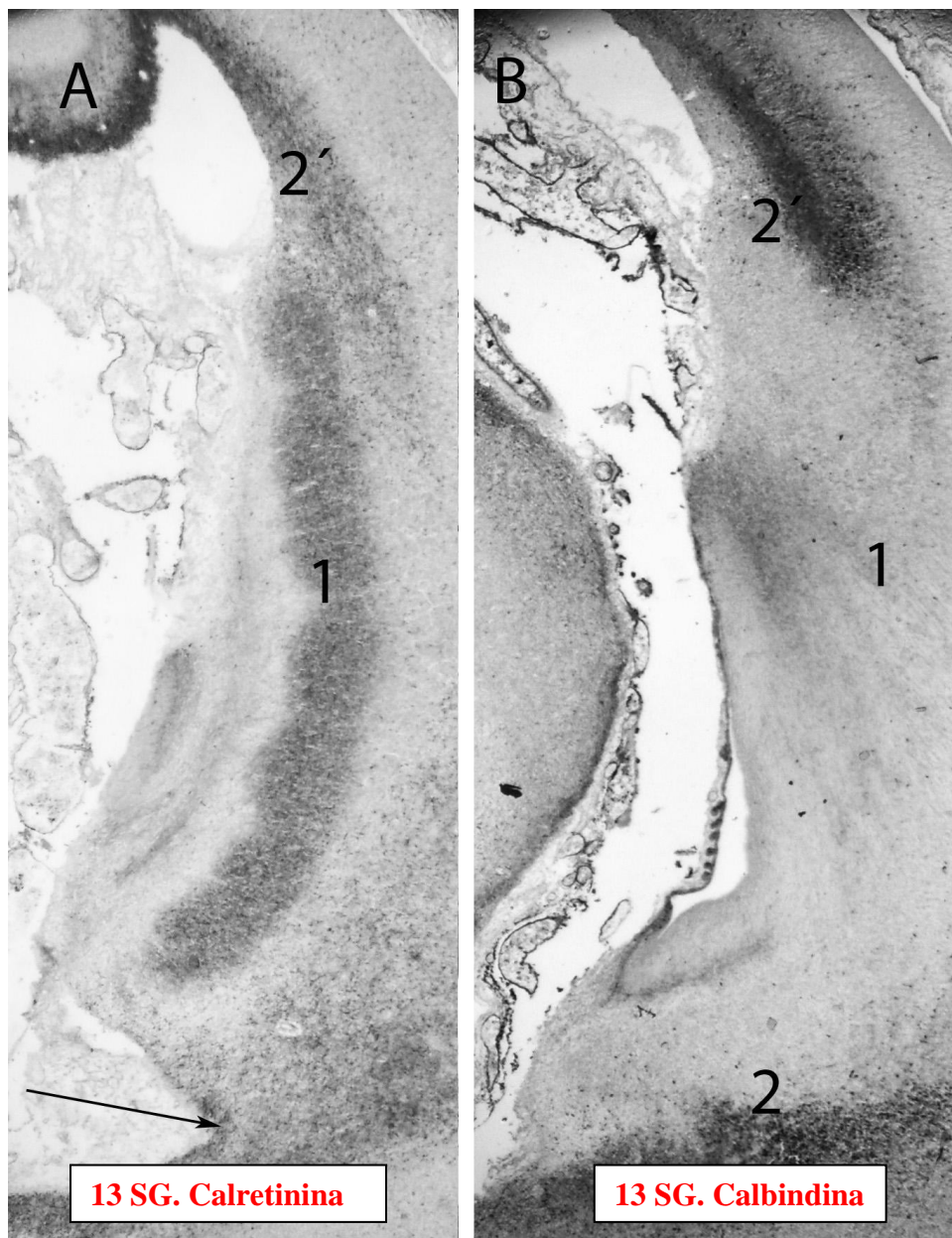


Figura 33: La unión entre hipocampo dorsal e hipocampo ventral (niveles posteriores). Con calretinina (33.A) y calbindina (33.B). Se observa la profundización de la fisura del hipocampo ventral (flecha) y la presencia de un giro dentado único.

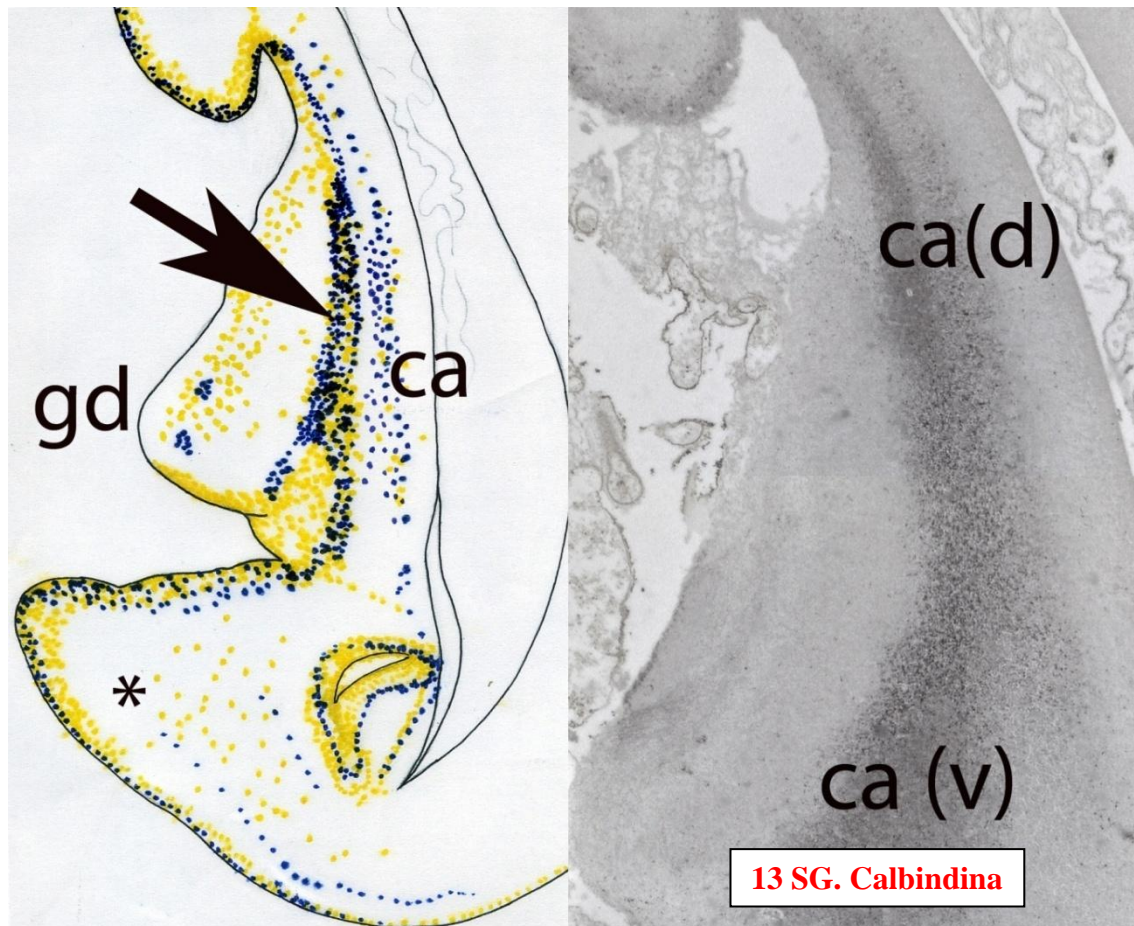


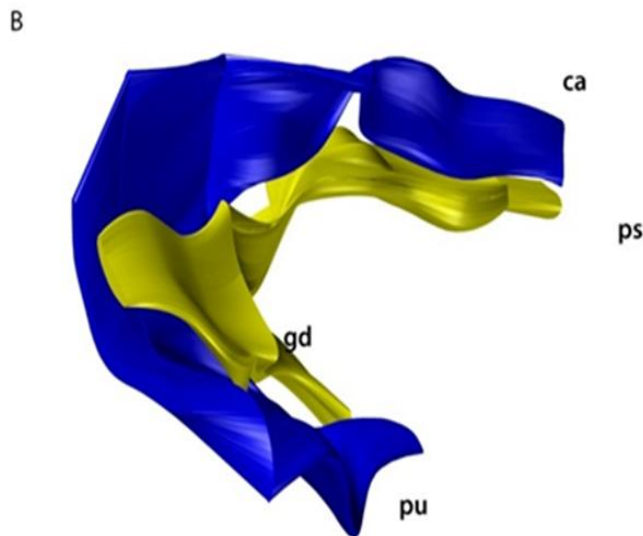
Figura 34: Esquema en el que se muestra la colocación de CB (azul) y CR (amarillo) en la unión de hipocampo ventral y dorsal y su distribución a lo largo de la fisura (flecha), en donde señalan la disposición de las neuronas de Cajal Retzius. El asterisco señala la corteza entorrinal. Gd: giro dentado. Ca: asta de Amón

I. 4. C. RECONSTRUCCIONES TRIDIMENSIONALES

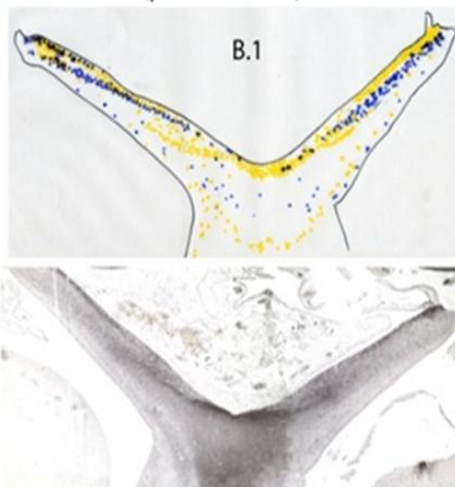
En el HC de 13 SG, el hito morfológico más importante es la profundización de la fisura del HC v. Además, el polo septal de la placa amónica se ve truncado por la aparición del cuerpo calloso. La presencia de una incipiente fisura del HC comienza a esbozar una separación entre GD y asta de Amón, que no obstante siguen encontrándose adyacentes. En el material de 13 SG se demuestra la presencia de un HC continuo en sentido dorso ventral (figura 35).

El hipocampo de 13 semanas: la cinta amarilla representa el primordio del giro dentado, siguiendo la distribución de las células calretinina +, mientras que la cinta azul representa la placa amónica

Corte: sagital
Vista: medial



En la imagen se muestra la extensión antero - posterior de placa amónica y primordio del giro dentado al final de la décimotercera semana del desarrollo. A partir de la lámina comisural (abajo) no es posible identificar primordio del giro dentado, aunque continúa existiendo un banda de células calbindina + (puntos azules)



La calretinina es expresada en la lámina comisural a lo largo de una delgada banda subpial, que parece corresponder con células Cajal Retzius

CR (amarillo); CB (azul)

Figura 35: reconstrucción tridimensional del hipocampo de 13 SG, en la que se pueden observar modelos del hipocampo fetal vistos desde la cara medial del hemisferio, a modo de cortes sagitales (arriba) .También se muestra un esquema de colocalización de CR y CB en el cuerpo calloso incipiente. (abajo)

I. 5. 14 Semanas: La profundización de la fisura del hipocampo.

A las 14 SG se mantiene en el asta de Amón y el GD un inmunofenotipo comparable al descrito en las dos semanas previas del desarrollo.

Entre la 14 -16 SG se produce un cambio importante en la morfología global del HC. El engrosamiento del polo uncal o eminencia hipocampal continúa su crecimiento y se convierte en la región dominante. Es en estas semanas en las que se produce la diferenciación prominente de la fisura del HC. A las 15 SG se produce una profundización notable de la fisura, mucho más evidente en el HC v. En el extremo uncal del HC v, en donde es mayor la anchura de la placa hipocampal, se advierte como en ciertas secciones coronales aparece una zona relativamente hipocelular. En las secciones inmediatamente posteriores a éstas la fisura del HC se percibe ensanchada a la vez que se observan ovillos vasculares que parecen constituir un frente de avance de la misma. De esta manera, interpretamos la fisura en áreas hipocelulares anteriores como resultado de la aparición de las capas moleculares del asta de Amón y el *subiculum* en el extremo anterior de la fisura y las identificamos con las regiones que han sido denominadas en estudios clásicos “zona de compresión” (Humphrey, 1967). El avance de la fisura del HC y los vasos que la acompañan (figura 37) coincide con el desarrollo diferencial del HC v y lo consideramos un fenómeno de importancia capital en la ontogénesis del hipocampo humano.

Esta profundización de la fisura se encuentra aparentemente en relación con la presencia de neuronas de Cajal Retzius en el frente de avance de la misma (figura 36 y 38). Estas neuronas se sitúan en la zona marginal de la fisura a lo largo de todo su recorrido y se acumulan en su fondo. Otro hecho reseñable es la identificación de anastomosis vasculares en el HC v que conectan las arterias superficiales con arterias fisurales (figura 38). Este sistema de anastomosis representa posiblemente la confluencia de los sistemas de la arteria coroidea anterior y la arteria cerebral posterior que irrigan al HC. La aparición de estas anastomosis coincide, pues, con el inicio del gran desarrollo de la fisura ventral. Mientras que con CB y con CR el inmunofenotipo del HC permanece

relativamente constante, con otras inmunotinciones se revela una progresiva maduración histológica que atañe fundamentalmente al HC v. Con tinciones para vimentina y GFAP se observa como en la cabeza del hipocampo comienza a formarse un esqueleto radial, constituyendo la primera evidencia del esqueleto glial propio (*scaffold* secundario) del GD (figura 41, A y B). En el frente de avance de la fisura del HC se advierte una gran concentración de células de Cajal Retzius que coexpresan p73 y Reelin (figura 38). Estas células, al igual que en edades previas, se disponen a lo largo de la superficie pial del HC. En la superficie pial fisural aumentan su número hasta alcanzar un máximo en la zona uncal anterior, coincidiendo con la fisura uncal.

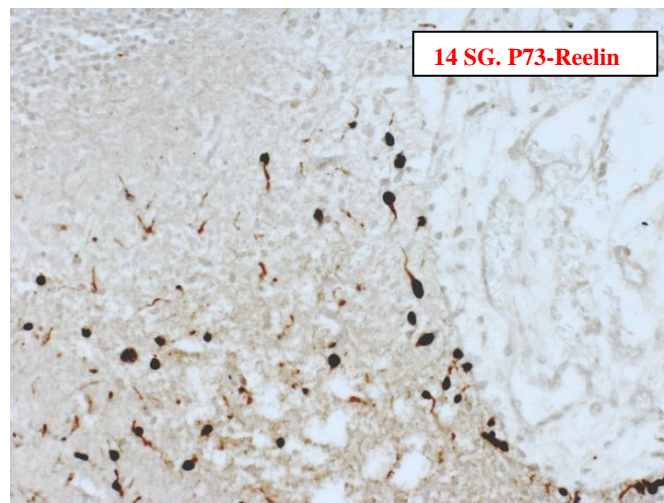


Figura 36: coexpresión de p73 (negro, nuclear) y Reelin (pardo, citoplasmático) en el acúmulo de Cajal Retzius de la fisura del hipocampo ventral

La zona marginal de la fisura del HC es muy amplia, aparece como un tejido muy laxo ocupado fundamentalmente por las células de Cajal Retzius y ricamente vascularizado (figura 37). Este tejido laxo mereció el nombre de zona difusa (Humphrey, 1967).

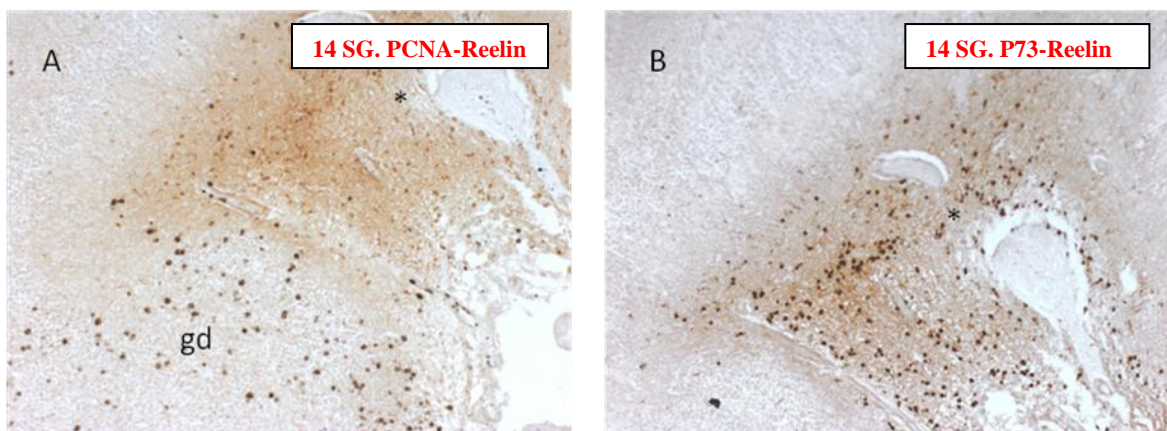


Fig 37: Detalle de la zona difusa de la fisura del Hc v mostrando los vasos fisurales (*) y la acumulación de neuronas de C-R (B)

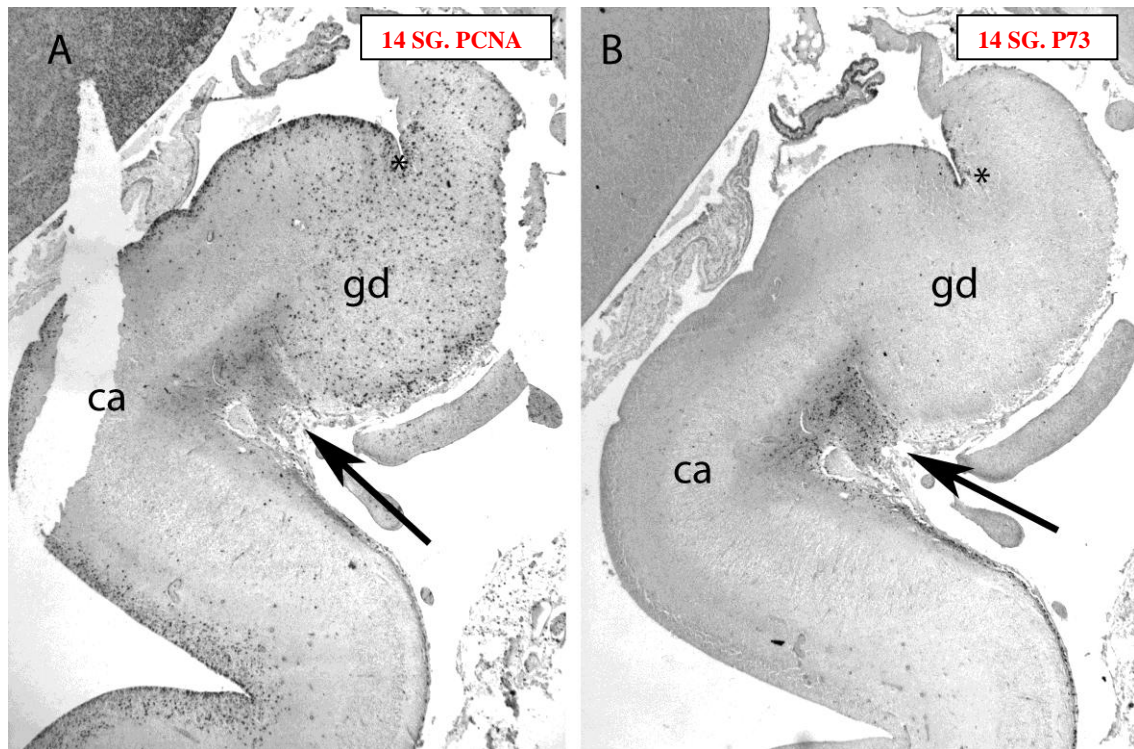


Figura 38: Fisura del hipocampo ventral: doble inmunohistoquímica con Reelin – PCNA (38.A) y Reelin-p73 (38.B). En la figura 38. B se observan las células de Cajal Retizus (reelin+, p73+) de la fisura del hipocampo. Ca: asta de Amón. Gd: giro dentado.

En la zona posterior, en donde es posible observar en las mismas secciones el HC d y el Hc v separadas por el tálamo posterior, se advierte un crecimiento notable del complejo fimbria-fórnix (sustancia blanca). En aquellos niveles en los que no se ha producido aún la fusión entre HC d y HC v se observa un anclaje del plexo coroideo a la punta de la fimbria (figura 39). En los niveles más anteriores del HC d se observa un segundo anclaje en el ángulo tálamo-estriatal (figura 39 A) que, conforme se avanza en el sentido posterior, y una vez que desaparece el tálamo, queda conectada a la fimbria ventral mediante la lámina de conexión (figura 39 B).

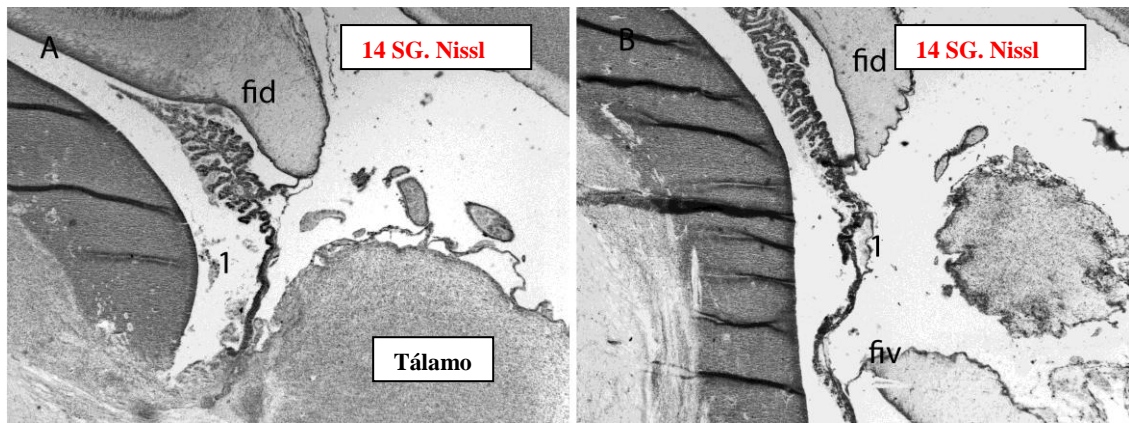


Figura 39: tinción de Nissl en el hipocampo dorsal anterior (39.A) y cercana a la unión entre hipocampo dorsal y ventral (39.B). En 39.A se observa como el plexo coroideo está unido a la fimbria dorsal (fid) y al surco talamoestriatal (1). En 39.B se observa la lámina de conexión (1) extendiéndose entre la fisura dorsal y la fisura ventral.

En niveles aún más posteriores a la lámina de conexión se observa la convergencia de ambas fimbrias e, inmediatamente posterior a la misma, aparece por primera vez en su plenitud una estructura que denominaremos “cruz del hipocampo”. Esta formación cruciforme está constituida por un GD con forma de “c” abierta hacia posterior (probablemente resultado de una sección coronal de una estructura con forma de semiesfera o sector esférico en el que penetran difusamente células del futuro campo CA3). El hilio aparece como una estructura intermedia entre la capa granular del GD y CA3 (figura 40).

Esta “cruz del hipocampo” es el representante humano de una estructura presente en ratones adultos, y a la que se ha prestado poca atención en la literatura hasta el estudio de Fanselow y Dong (2010). Por último, se advierte también la aparición de un *notch* en el extremo uncal del hipocampo; es la primera evidencia en nuestro material de esta estructura a nivel ventral. Se observa inmunotinción para PCNA en la superficie ventricular del *notch*, lo cual indica la persistencia de la actividad mitótica en la primera matriz del dentado. Mientras tanto se observa un notable desarrollo de la segunda matriz del dentado (figura 41C).

Panorámica (Nissl) de la unión de hipocampo dorsal y ventral en un nivel posterior y lateral, observándose un primordio de la estructura cruciforme que, en edades más avanzadas, va a estar constituida por CA3.

fi: fisura
x: futuro CA3
gd: giro dentado
pc: plexo coroideo

14 SG. Nissl

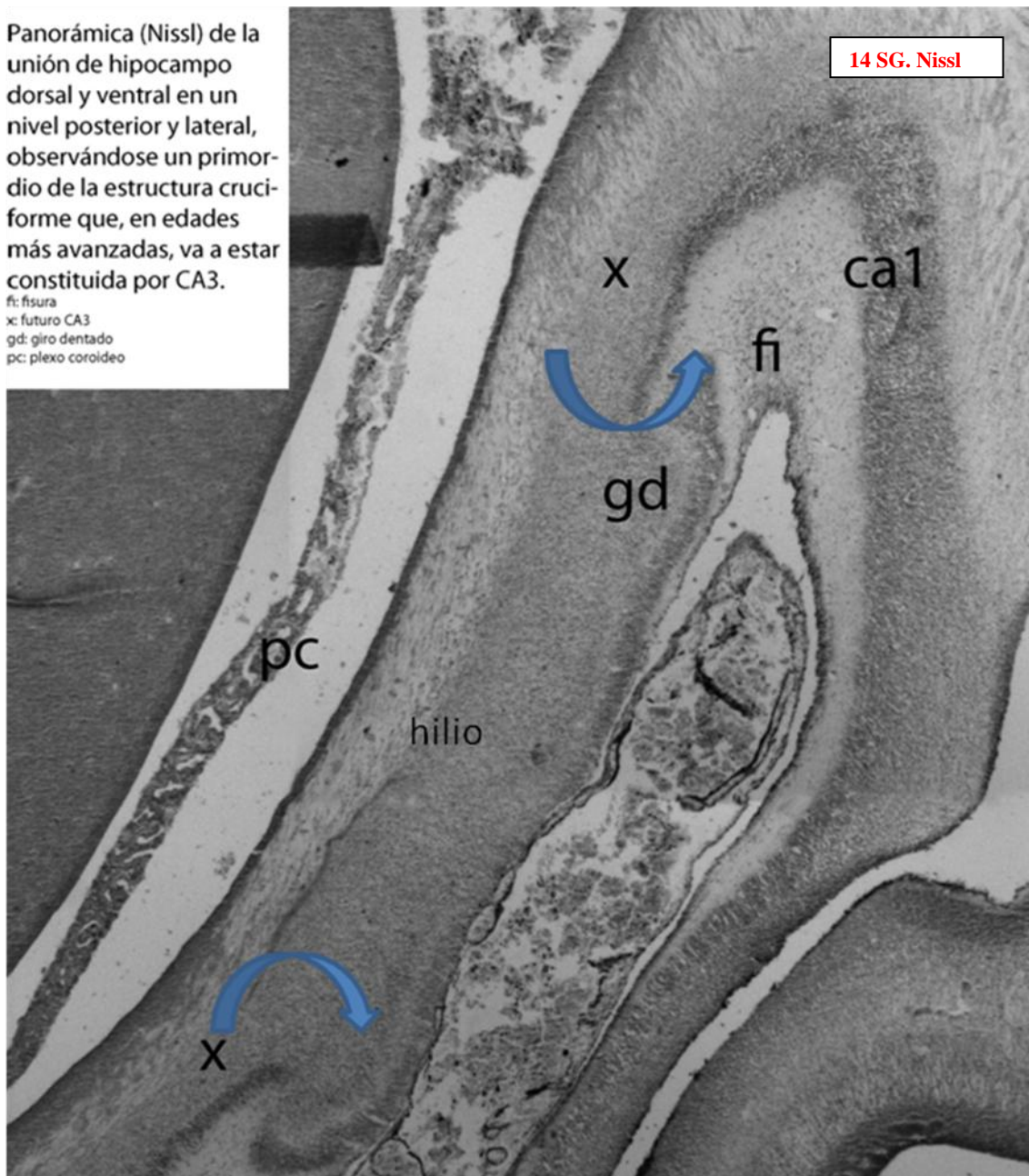


Figura 40 (sagital): la unión entre hipocampo dorsal y ventral (cruz del hipocampo) con Nissl. Fi: fisura del HC; x: futuro CA3; gd: giro dentado; pc: plexo coroideo. Las flechas señalan la dirección del crecimiento de los brazos de CA3 (x) en el interior del hilio.

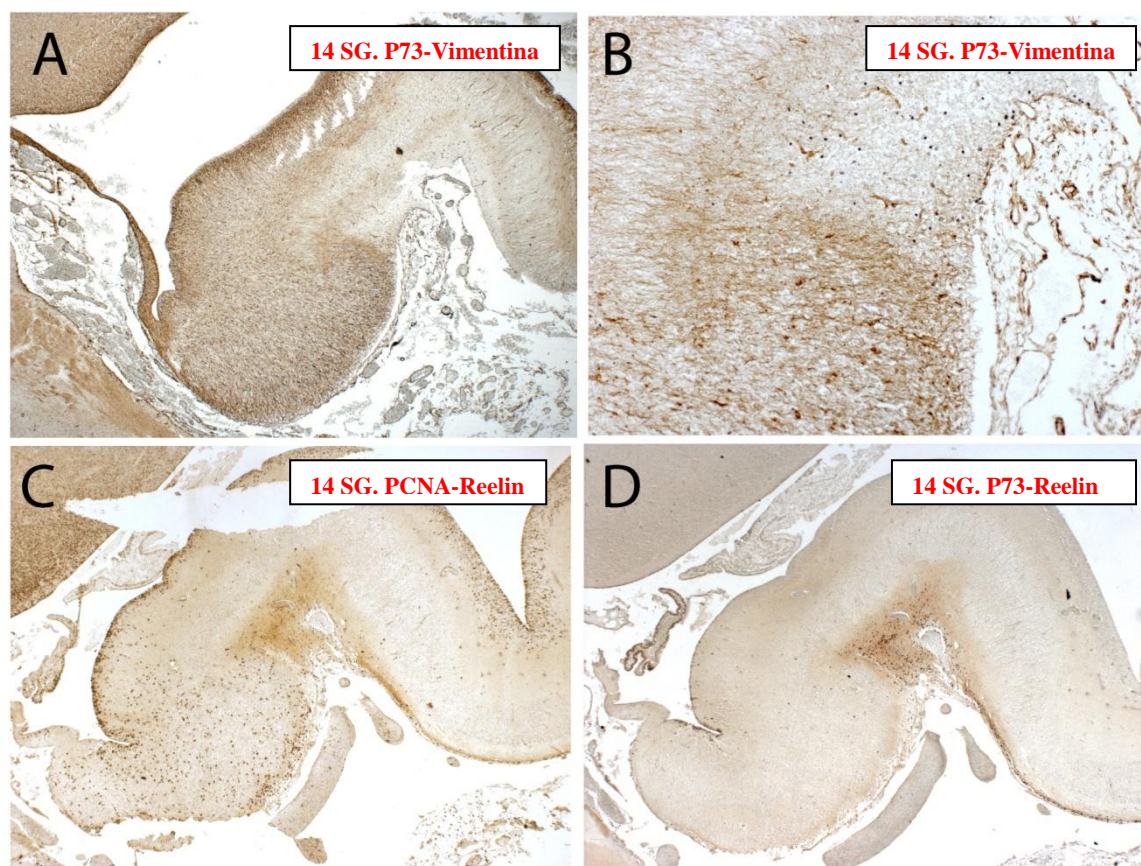


Figura 41 .Las diferentes poblaciones celulares en torno a la fisura del hipocampo ventral. 41.A y B el scaffold secundario glial radial con vimentina junto con las neuronas de Cajal Retzius de la fisura del hipocampo p73+. 41 C: migración del giro dentado con PCNA y Reelin en las neuronas de Cajal Retzius de la fisura. 41 D : células de Cajal Retzius p73+ / Reelin +en la fisura

I. 5. C. RECONSTRUCCIONES TRIDIMENSIONALES.

Salvo por la presencia de un HC d aún relativamente prominente, una reconstrucción tridimensional del HC de 15 semanas genera una imagen conceptualmente similar a la del adulto. El polo uncal se ha expandido y diferenciado y domina ampliamente sobre el polo septal del HC. La fisura se profundiza y da lugar a una imagen similar a la que se obtiene de reconstrucciones en individuos adultos. El cambio más importante, que se esbozaba en inmunotinciones con CB a las trece semanas, pero no es morfológicamente evidente hasta las 14 – 15 semanas, es el desarrollo de CA3. Esta imagen se ha obtenido a partir de las secciones, teñidas con Nissl, publicadas online por el Allen Institute (www.brain-map.org) y reconstrucciones gráficas tridimensionales realizadas con autoCAD. Aunque la imagen ha sido volteada a conveniencia, la reconstrucción se efectuó a partir de secciones coronales (figura 42).

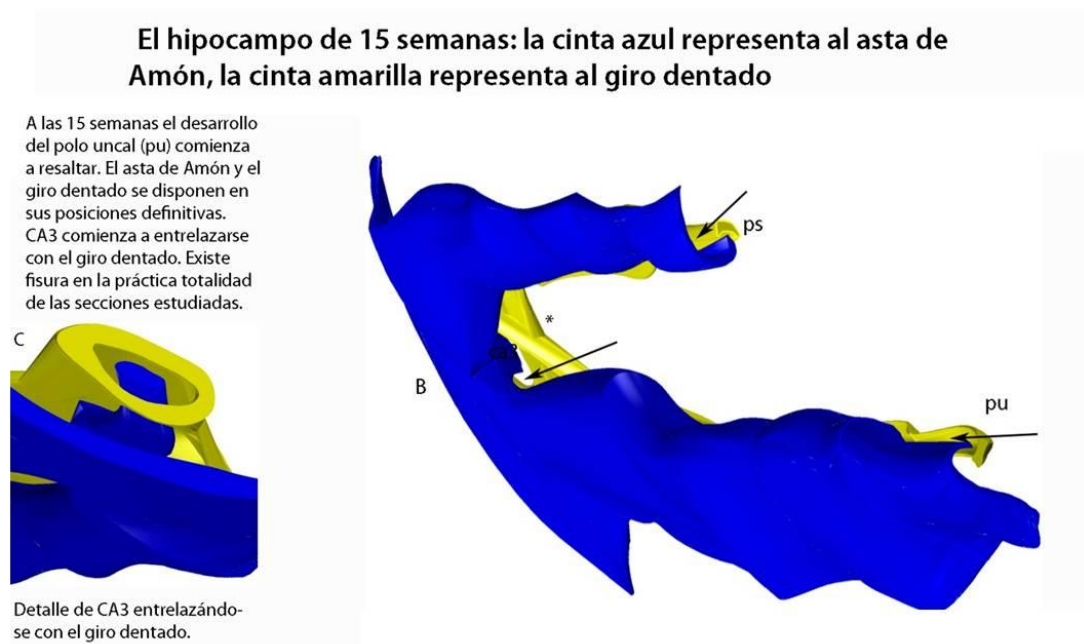


Figura 42 (visión sagital): reconstrucciones tridimensionales del hipocampo izquierdo de 15 SG. La cinta amarilla representa el volumen del Gd y la cinta azul representa el volumen de la capa de células piramidales del CA. Las flechas señalan la fisura del HC.

I. 6. 16 - 17,5 semanas: atrofia del hipocampo dorsal.

En los fetos de 16 y 17 SG se producen cambios globales en la anatomía telencefálica que afectan al HC en formación. Se produce una profundización de la cisura silviana junto con un avance caudal del cuerpo calloso.

La inmunoreactividad CB+ continúa siendo una característica de la placa amónica. En los niveles dorsales más anteriores puede observarse una *tenia tecta* por delante del cuerpo calloso y un posible *induseum griseum*, ambos CB+, por encima del cuerpo calloso. En niveles dorsales más posteriores se observa como la CB se expresa en las neuronas piramidales de un HC d ya atrófico, o al menos disminuido de tamaño. En los niveles posteriores a la eminencia ganglionar caudal y al tálamo posterior pueden verse ambos HC unidos por el fórnix; producto de la unión de ambas fimbrias. A las 17 semanas la CR pierde parcialmente su utilidad para diferenciar el GD del Asta de Amón, porque tanto los granos recién nacidos del GD como el hilio son CR+. La CR se expresa también en numerosas interneuronas del asta de Amón.

I. 6. A. HIPOCAMPO DORSAL.

En el HC d de 16 SG no se observa esqueleto glial radial secundario (*scaffold*) del HC. Existen células vimentina + en el asta de Amón dorsal que extienden prolongaciones fibrilares de morfología radial. Estas prolongaciones, en el rudimento amónico, se extienden desde la superficie ventricular hasta la superficie pial (figura 43, B). No obstante, en el área del futuro GD, se identifican células dispersas de morfología multipolar. Esta ausencia de disposición radial de la glía en el GD dorsal coincide en el tiempo, no obstante, con una segunda matriz proliferativa del GD aún activa.

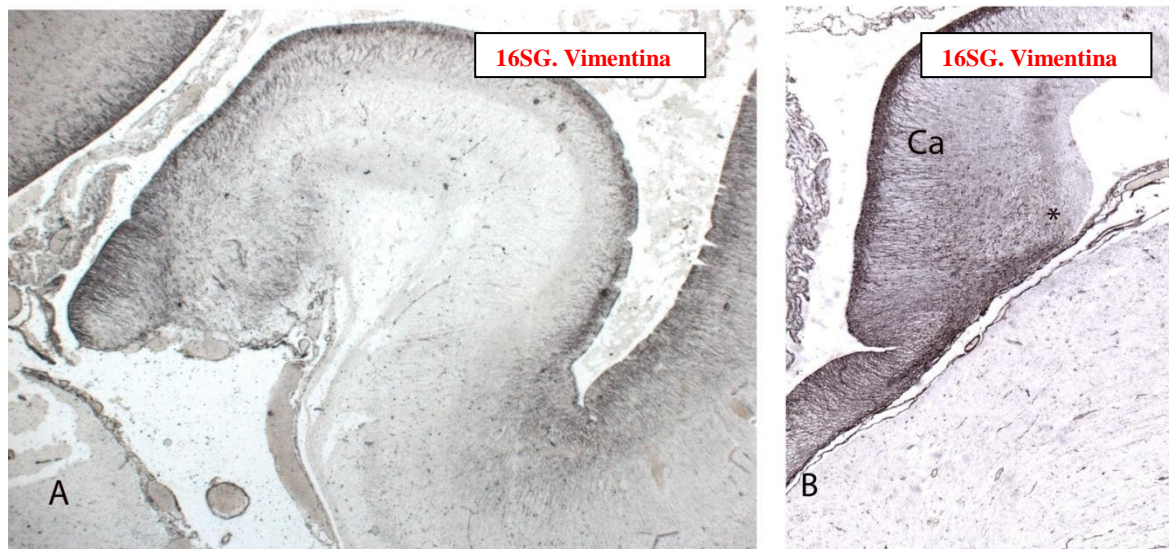


Figura 43. 43.A Scaffold secundario glial radial secundario del giro dentado ventral, asociado a la presencia de una fisura profunda con ancha zona marginal y anastomosis vasculares. 43.B Disposición de la glía radial en el hipocampo dorsal, donde se observa la ausencia de scaffold en la zona del giro dentado (*)

A las 17,5 semanas, gran parte de las áreas dorsales y anteriores del hipocampo se encuentran sustituidas por el cuerpo calloso, que aparece como una gran masa de sustancia blanca en crecimiento cruzando la línea media (figura 44). Lateralmente al mismo se encuentran dos vestigios del antiguo HC d. Con PCNA se demuestra como en esta estructura aparentemente vestigial pervive una segunda matriz del GD, en forma de células inmunorreactivas dispersas (figura 44, B). Se advierte también la presencia de glía vimentina + altamente desorganizada pero aún presente, que no muestra disposición radial y es rica en células gliales de aspecto astrocitario (figura 44, C).

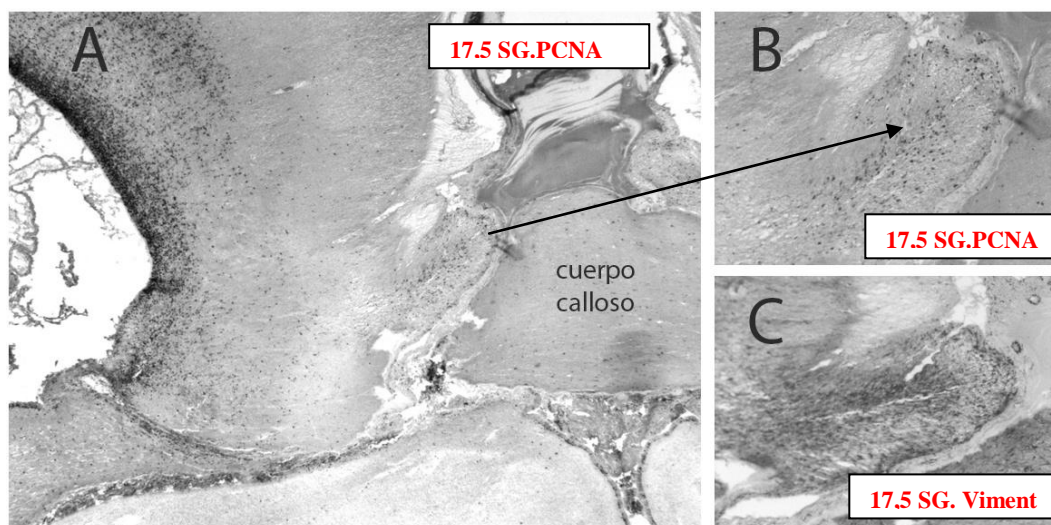


Figura 44. El hipocampo dorsal anterior en una región ya ocupada por el cuerpo calloso (44.A) en la que se observan, en detalle, los restos de la segunda matriz del dentado con PCNA (44.B) y la ausencia de scaffold secundario glial radial (44.C)

I. 6. b. HIPOCAMPO VENTRAL.

A partir de las 17,5 SG la historia del HC es la del HC v. En esta edad se acentúa el desarrollo diferencial de la fisura del HC. Las fisuras del HC d y del HC v se encuentran delimitadas por una capa de células de Cajal Retzius (figura 45, A). La expresión de CR en estas células, junto con su intensa expresión por parte de células hiliares y los granos del GD recién formados, permite delimitar bien la fisura (fisura uncal) que en el polo uncal, en donde se encontraba la antigua eminencia hipocampal, se ensancha y se bifurca ampliamente, adoptando una morfología alambicada (figura 45, B).

En los niveles ventrales posteriores esta fisura muestra un aspecto profundo pero más simple, y se puede observar como la fisura del HC d confluye con la fisura del HC v, dando lugar a una imagen en espejo (figura 46). La fisura del HC d es poco profunda, y su profundidad disminuye aún más conforme se avanza hacia niveles anteriores. En el HC d no es posible detectar la presencia de grandes invaginaciones de la piamadre ni grandes ovillos vasculares a diferencia de su contraparte ventral.

A partir de la 17,5 SG comienza a observarse una de las características de la fisura del HC adulto: progresivamente se oblitera para acabar constituyendo un espacio virtual más que una verdadera cisura en gran parte de su recorrido (figura 47).

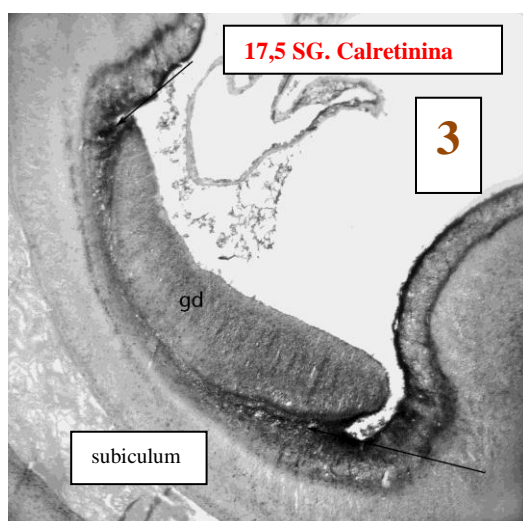
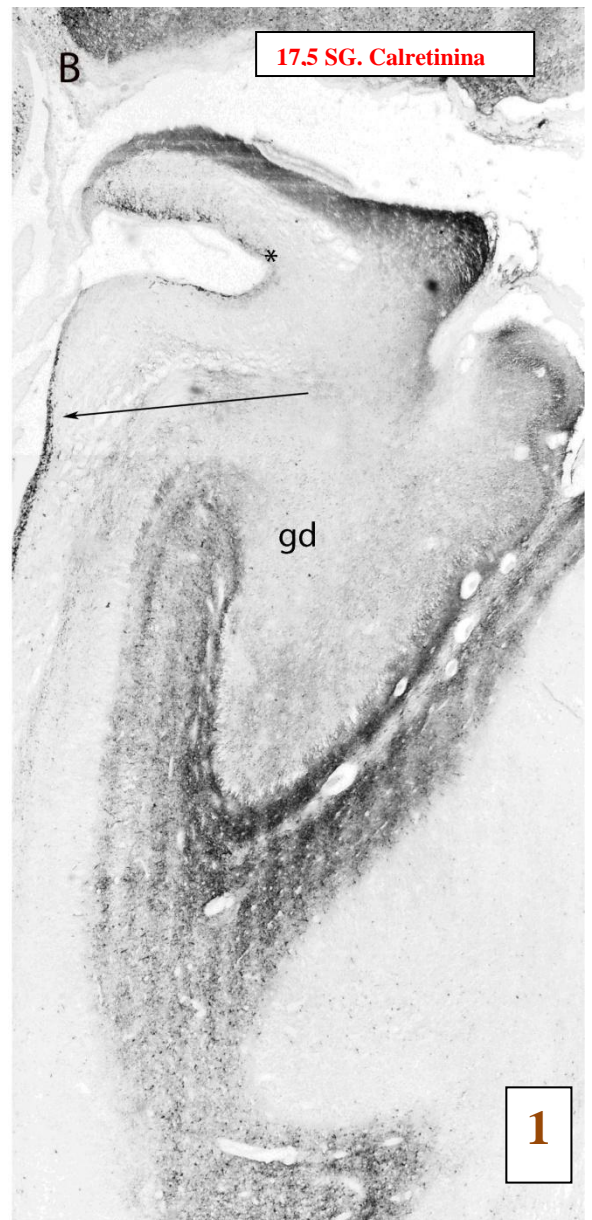
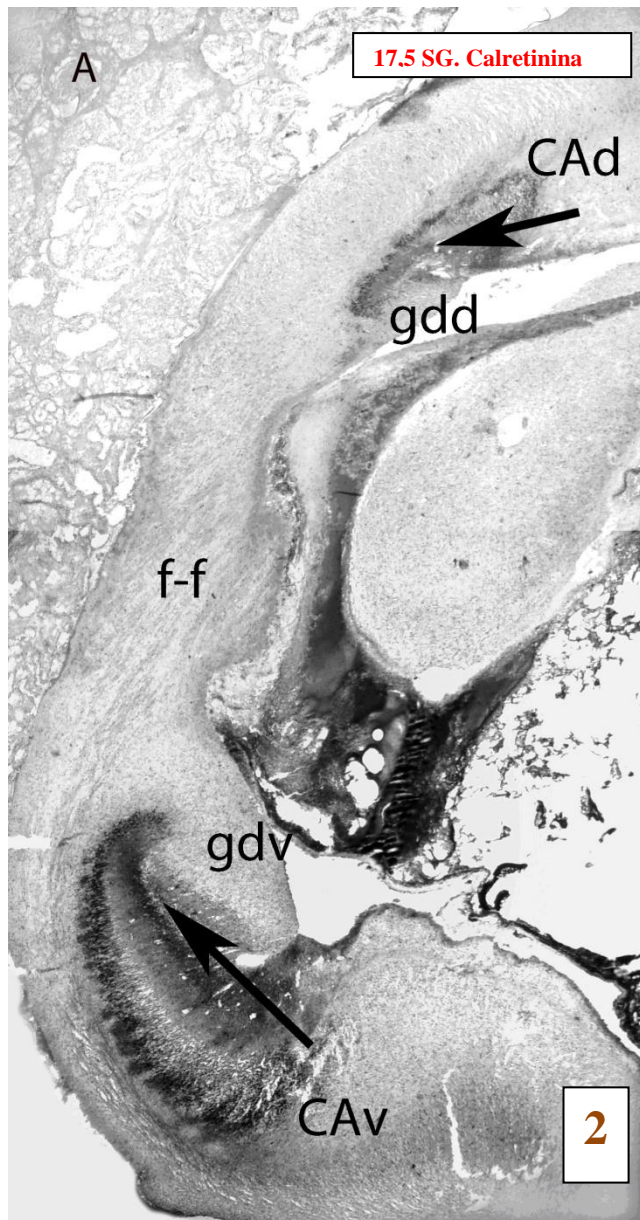


Figura 45 (arriba). Microfotografías de la disposición de la calretinina en la unión entre HC d e HC v (45.A) y en la cabeza del hipocampo ventral (45.B). La flecha señala la superficie ventricular en 45.B y la fisura ventral en 45.A. *: notch; f-f: fimbria – fórnix; gdd: giro dentado dorsal; gdv: giro dentado ventral; CAv: asta de amón ventral.

Figura 46. (izquierda). Calretinina en la unión entre hipocampo dorsal y ventral: se observa un giro dentado único con forma de salchicha y una fisura ventral profunda (flecha)

Figura 45 y 46: Los números representan el orden de las secciones desde más anterior (1) hasta más posterior (3).

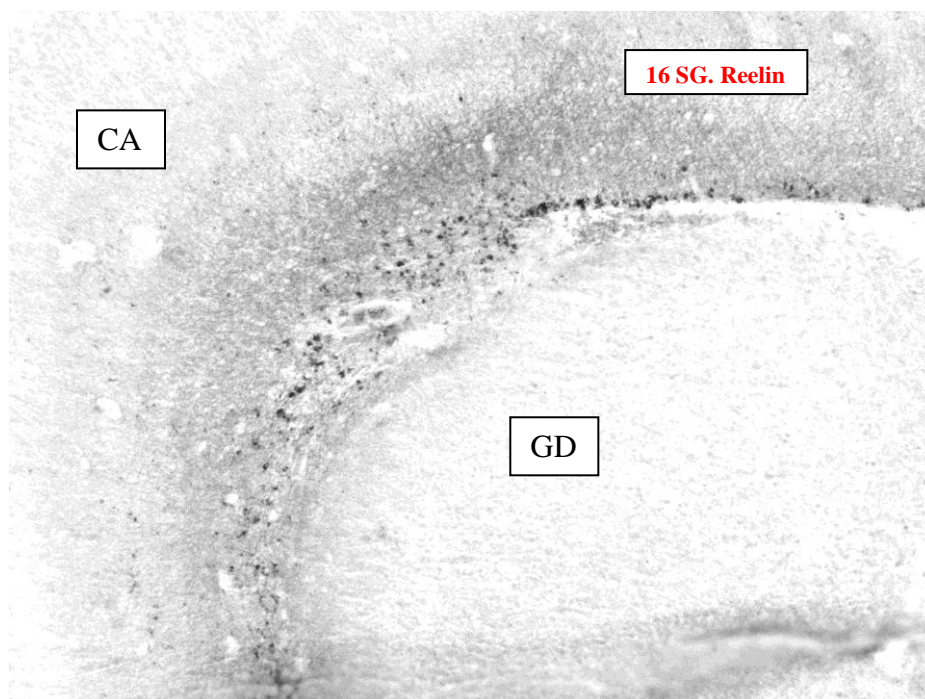


Figura 47: células de cajal Retzius p73+ Reelin + en la fisura del hipocampo ventral

Otra de las características diferenciales del HC v frente al HC d entre la 16-17 SG es el gran desarrollo de la migración del GD. A las 17 SG es posible observar en el HC v, entre el GD y la fimbria, una escotadura ancha y profunda que representa un ensanchamiento del *dentate notch*. Es evidente una segunda matriz activa de disposición predominantemente subpial. La característica fundamental de la migración del dentado a las 17 semanas es la aparición de un tercer componente formado por células PCNA+ que se desprende de la **segunda matriz** del dentado hacia el hilio del dentado, que será el lugar de asiento definitivo de la neurogénesis del GD. Esta última corriente corresponde con la **tercera matriz** de Altman y Bayer (figura 48, B).

Estos cambios van acompañados de una maduración del *scaffold* secundario glial observable con vimentina (figura 48 A). Con vimentina se observa una banda de células gliales que se dispone en el área del GD ofreciendo prolongaciones de morfología radial que se disponen hacia el hilio del HC y, por lo tanto, enfrentadas a las prolongaciones radiales del asta de Amón. Esta especialización de la glía radial representa la formación de un *scaffold* secundario o esqueleto glial específico del GD y coincide con la

aparición de los primeros indicios de una tercera matriz y la actividad proliferativa hiliar.

En proximidad al naciente esqueleto glial secundario la fisura alcanza una profundidad notable y se observa la presencia de gran cantidad de tejido conjuntivo pial así como grandes anastomosis vasculares que comunican los vasos de la fisura del hipocampo con las estructuras vasculares que se encuentran en relación con los plexos coroideos. Estas conexiones vasculares, sólo presentes en niveles ventrales, probablemente correspondan con sistemas anastomóticos entre las arterias del uncus derivadas de la corioidea anterior y las arterias fisurales derivadas de la cerebral posterior (figura 48. A). La presencia de estas conexiones parece guardar relación con la profundidad y “actividad” de la fisura del hipocampo y constituye, por tanto, un factor diferencial entre el HC d e HC v.

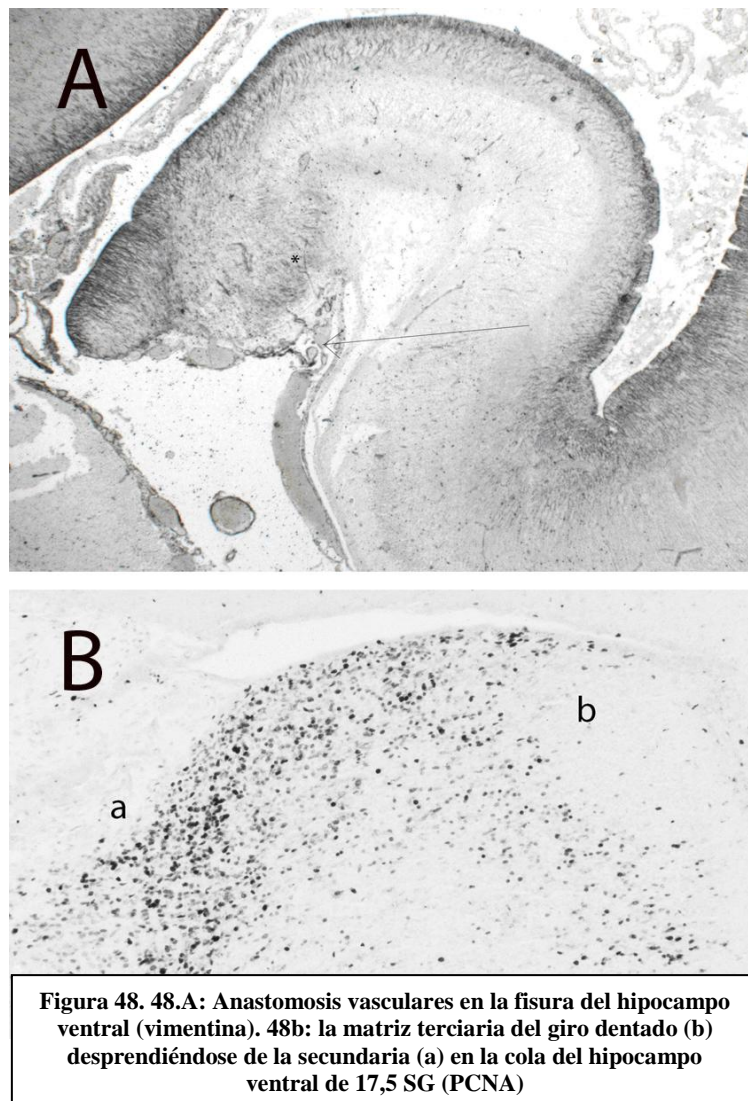


Figura 48. 48.A: Anastomosis vasculares en la fisura del hipocampo ventral (vimentina). 48b: la matriz terciaria del giro dentado (b) desprendiéndose de la secundaria (a) en la cola del hipocampo ventral de 17,5 SG (PCNA)

A partir de las 17 semanas se refuerza en el HC v el crecimiento del polo uncal, destinado a formar la cabeza del HC. En el HC de finales del primer trimestre se observaba como la placa hipocampal se encontraba ampliamente ensanchada, a modo de eminencia, en los niveles ventrales más anteriores. A las 17,5 semanas el HC ha aumentado su grosor en esta región (figuras 49 y 50). Con CR se puede observar la presencia de un primordio del GD en superficie. La CR en esta edad permite identificar tres poblaciones celulares diferentes: las células primordiales del giro dentado, granos del dentado y células de Cajal Retzius (con Reelin, en la figura 51, A y B) situadas subyacentes a la superficie de la piamadre (figura 49, A).

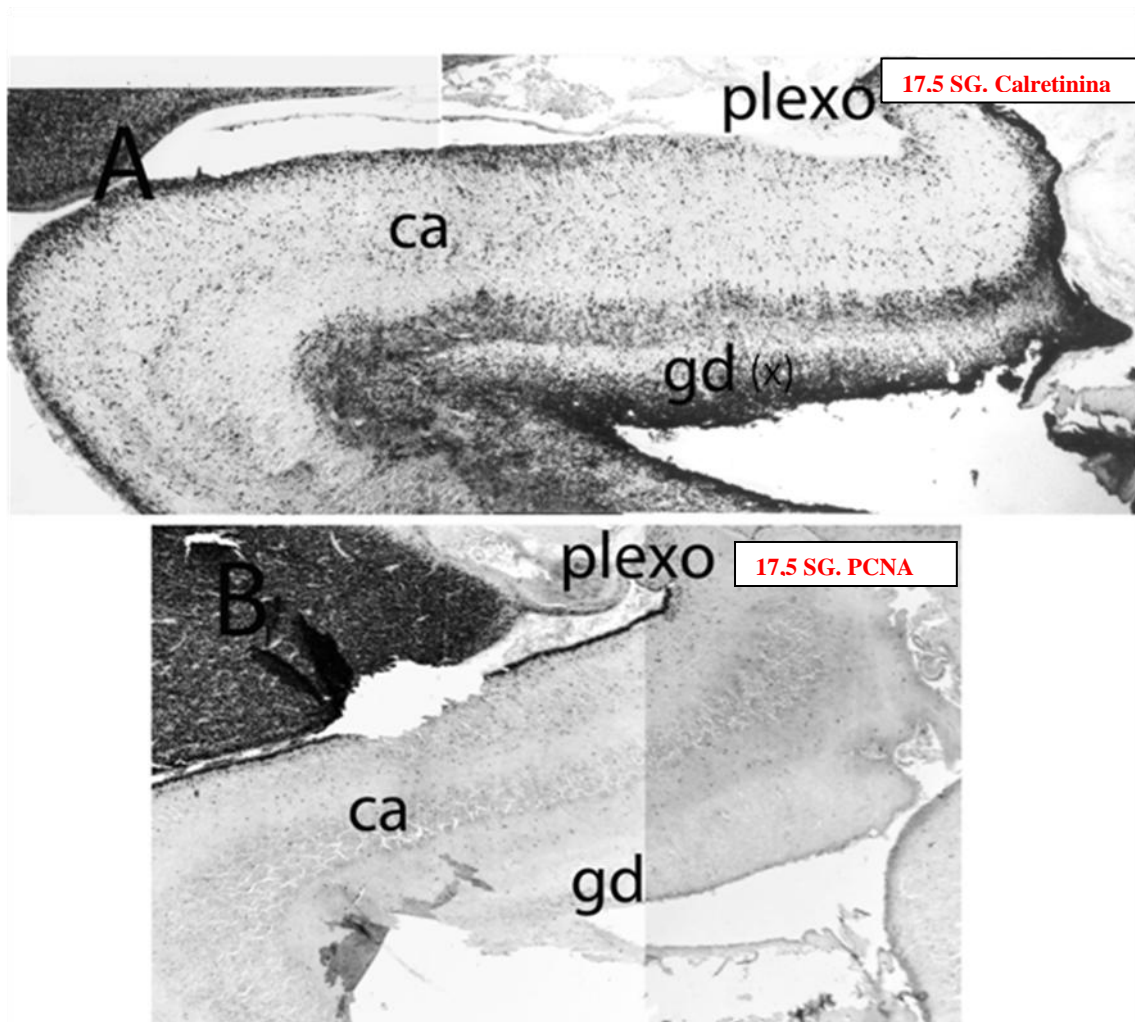


Figura 49: La eminencia hipocampal a las 17,5SG con calretinina (A) y PCNA (B). Con calretinina se aprecia la presencia de una zona marginal que se corresponde con el extremo anterior del giro dentado y se encuentra intensamente teñida a expensas de la presencia de células primordiales del giro dentado y células de Cajal Retzius (gd) . En 49. A gd(x) marca un nivel en el que se acumulan células de C-R CR+ y que es inmediatamente rostral a la llegada del GD.

Esta región, predecesora del uncus, no muestra fisura del HC a las 17,5 SG. Asimismo, carece de fimbria y unión fimbria plexo coroideo. En estos niveles uncales descritos, es llamativa la ausencia de corrientes migratorias del dentado PCNA+ a las 17,5 SG (figura 49, B). Estas no se identifican hasta niveles más posteriores, siempre en relación con la presencia de una fimbria y un plexo coroideo (figura 50).

En vecindad a la superficie pial se observan grupos de células PCNA + pertenecientes a la matriz secundaria del GD. **Estas células proceden de niveles posteriores en los que existe fimbria y plexo coroideo** (figura 51, C y D). En definitiva, la eminencia hipocampal es una región del HC v que evolucionará hacia la cabeza del HC, dando lugar al HATA (área de transición amigdalina hipocampal) y las regiones subiculares y amónicas uncales. A las 17,5 SG no existe una matriz primaria o secundaria uncal; los granos del dentado colonizarán la región uncal desde niveles posteriores y proliferarán notablemente a lo largo de la segunda mitad del segundo trimestre del embarazo (figura 50). Esta región del GD corresponde con la región del mismo que, en el adulto, aparece en la superficie del labio superior de la fisura uncal (Duvernoy, 2005). Esta región es la denominada *pars apperta* de la banda de Giacomini o *margo denticulatus*. En esta región de la cabeza del HC v, la fisura del HC se forma como una invaginación de la piamadre de la fisura uncal. A las 17,5 SG la fisura del HC no separa completamente el GD del CA en estos niveles uncales (figura 50, A).

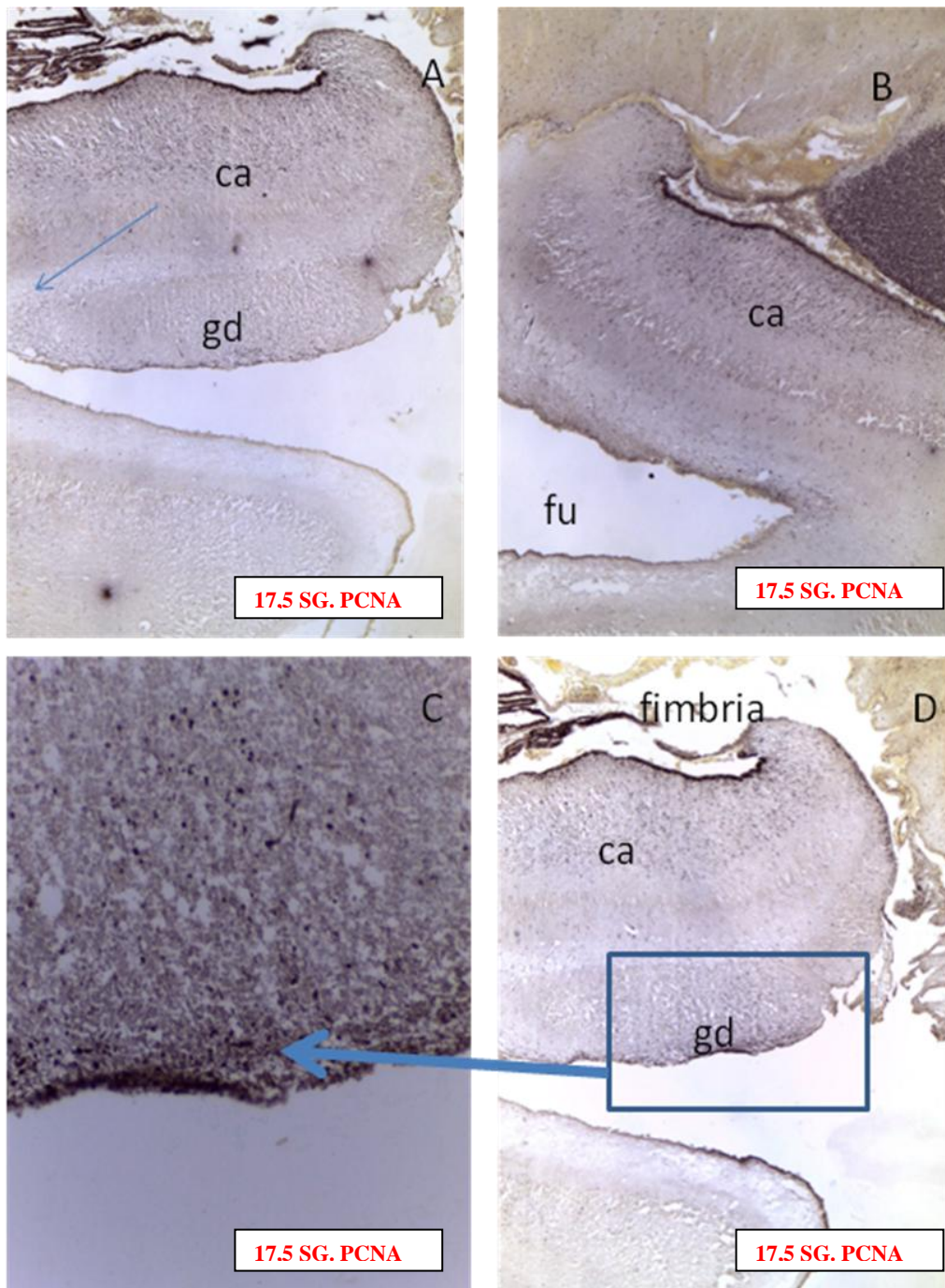


Figura 50: PCNA en la eminencia hipocampal. Existe muy escasa cantidad de células granulares PCNA + en la zona subpial del giro dentado (C, D) que se encuentra separado del asta de Amón por un incipiente fisura del hipocampo (flecha) que en estos niveles es derivada de la fisura uncal (fu) . A y B son tinciones de PCNA de hemisferios opuestos

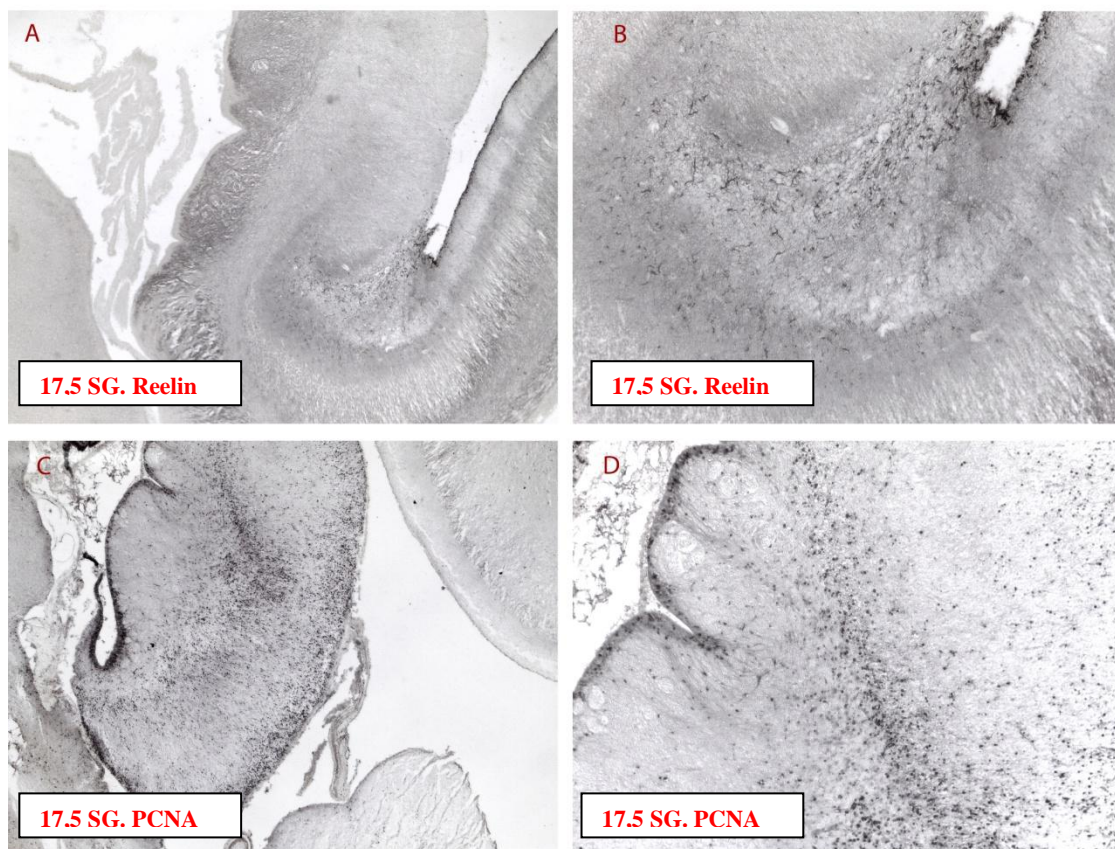


Figura 51. 51A y B: Reelin en la fisura del hipocampo ventral a nivel del uncus posterior. 51C y D: matriz secundaria del gd en un nivel posterior de la cabeza del hipocampo

21 semanas: la historia del hipocampo ventral.

1. 7. a. HIPOCAMPO DORSAL.

El HC d del feto de 21 SG ha desaparecido casi completamente en niveles dorsales anteriores. Solamente se observan restos de arquicorteza inmediatamente suprayacentes al cuerpo calloso formando el induseum griseum y que se continúan con la corteza cingular. Estos restos muestran leve inmunorreacción a la CR y a la CB y son fácilmente identificables con tinciones histológicas como el violeta de cresilo.

En niveles dorsales posteriores aún es posible identificar un rudimento del HC que se encuentra en continuidad con un HC v. Esta continuidad no se produce en los niveles en los que existe fimbria y fórnix sino en los niveles posteriores. El HC d correspondiente a los niveles en los que, al final de primer trimestre, ambos HC se encontraban separados por fimbria – fórnix formando una imagen especular, ha desaparecido por completo.

El rudimento del HC d muestra características arquitectónicas, citológicas e inmunohistoquímicas análogas a las de la cola del HC v. La placa amónica sigue demostrando tinción con CB, mientras que el GD ha perdido definitivamente la tinción diferencial con CR que le caracterizaba en edades previas. La inmunotinción con CR resalta ahora en la zona fisural debido a su expresión en las neuronas de Cajal Retzius. La fisura del HC está presente en los niveles dorsales, pero muestra muy poca profundidad y escasa cantidad de tejido conectivo vascular. En general la morfología del HC d que persiste bajo el cuerpo calloso es la de un HC de menor tamaño y aspecto atrófico, siendo su principal señal de identidad el escaso desarrollo de la fisura (ver más adelante).

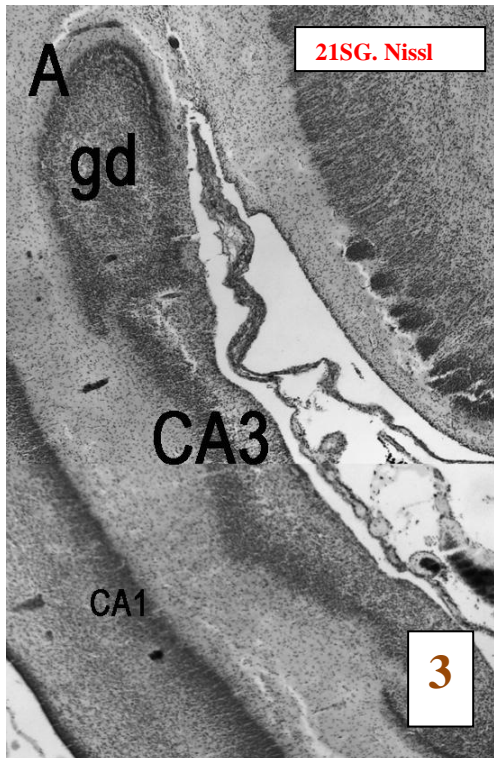
I. 7. b. HIPOCAMPO VENTRAL.

El HCv ha continuado su maduración. La fisura del HC ha continuado su profundización, también en la cola del HC. Su extremo más profundo ya se encuentra obliterado, remarcado por la presencia de células de Cajal Retzius y vasos. Continúa existiendo una población abundante de células de Cajal Retzius CR+, Reelin+ y p73+ en los márgenes de la fisura, acompañada de gran cantidad de tejido conectivo y vascular. La CR se expresa en el *subiculum* y gran cantidad de interneuronas, así como en granos del GD inmaduros marcando específicamente el hilio del dentado.

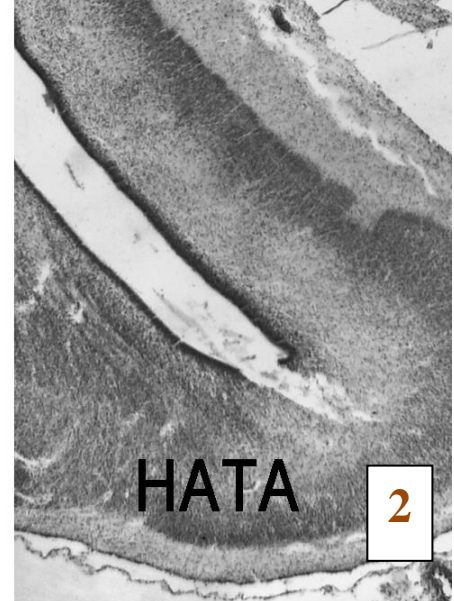
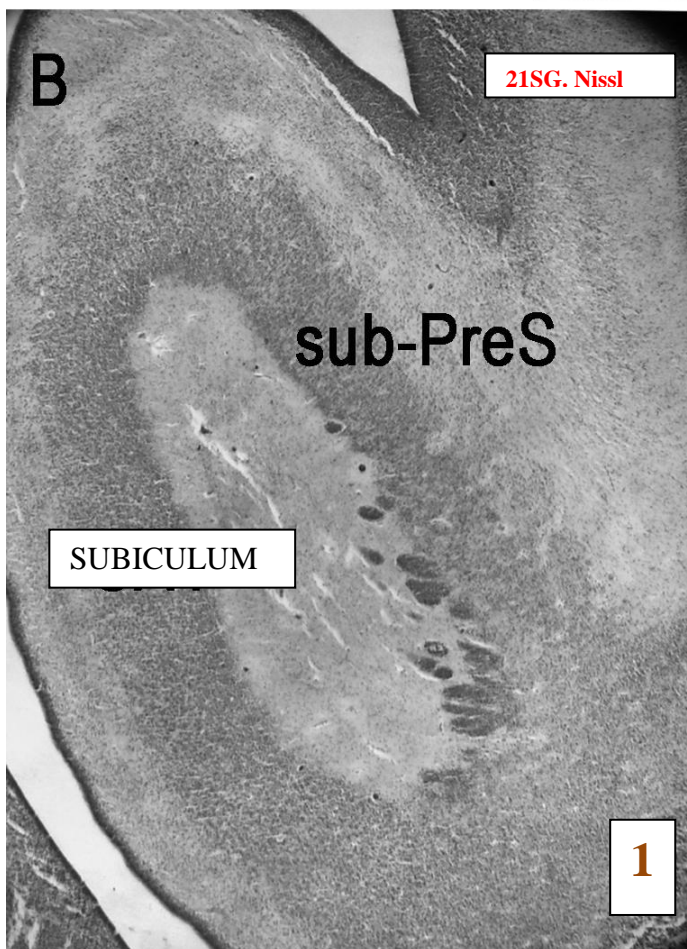
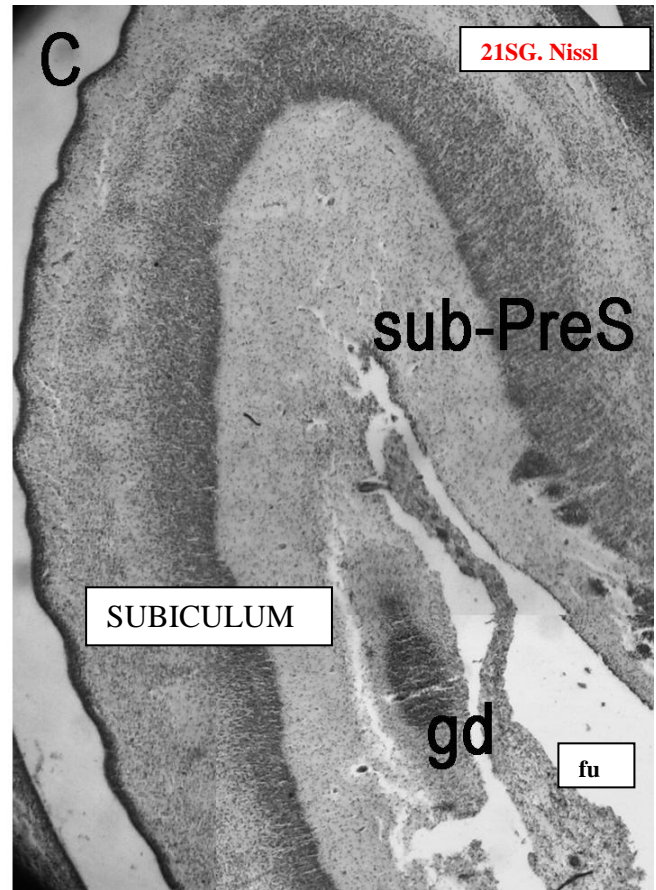
Los principales cambios en el HC de 21 semanas se producen en la cabeza del HC y ya se insinuaban en la región uncal del HC de 17,5 semanas.

En las secciones más anteriores, adyacentes a la región denominada clásicamente como HATA, la cabeza del HC está compuesta casi en exclusiva por asta de Amón, *subiculum* y *parasubiculum* (figura 52, B). En secciones coronales se observa como estas regiones forman una estructura anular que indica la presencia de un “fondo de saco “ en las regiones anteriores formado por asta de Amón y las estructuras subiculares (figura 52, B). Así pues, el extremo uncal del HC está formado por *subiculum*. En el polo uncal no existe GD, ni fisura, ni fimbria. Aunque en el polo uncal no existe fisura del HC se reconoce la fisura uncal entre asta de Amón, *subiculum* y corteza entorrinal. En secciones levemente posteriores se objetiva la aparición de un GD situado bajo la superficie pial, pero aún no separado del asta de Amón por una fisura (figura 52, C). Este dentado muestra morfología anular, sugiriendo la presencia de un fondo de saco conformado por el GD. Conforme avanzamos hacia regiones posteriores, aún en la zona uncal, encontramos la aparición de un CA3 y la apertura del GD, antes anular (figura 52, A). En estas regiones aún no se identifica fimbria ni plexo coroideo. No obstante, se puede identificar en todos ellos la presencia de una matriz terciaria en el GD con PCNA.

Figura 52 (página siguiente). Secciones sagitales de la región uncal con Nissl en un nivel anterior (52.B), intermedio (52.C) y posterior (52.A). En el extremo anterior se aprecia como la formación hipocámpal, en la que ya se distingue *subiculum*, muestra morfología anular, resultado del corte. La zona hipocelular central corresponde a la confluencia de las zonas moleculares enfrentadas del *subiculum* y el *presubiculum*. Los números de la esquina inferior derecha indican el orden de anterior a posterior.



Arriba (A): polo uncal en un nivel más posterior que "B", con el giro dentado ya formado



Arriba: polo uncal, en el que se observa HATA, subiculum con presubiculum, CA1 y el inicio del giro dentado

Izquierda: Polo uncal, nivel anterior

A lo largo de la cabeza y la cola del HC comienza a aparecer las invaginaciones e indentaciones de la capa principal de células del GD que otorgan a esta estructura su nombre. Por último, cabe señalar la presencia, en la región más posterior del HC, de una conexión entre HC d e HC v. Esta conexión se sitúa por detrás de la unión fimbria – fórnix y muestra morfología cruciforme: se encuentra formada por CA1, CA3 y un GD con una región hiliar bien diferenciada (figura 53, C). El hipocampo de 21 SG es la última edad en la que, en nuestro material, es posible identificar esta estructura cruciforme que marcaría la transición entre HC d y el HC v.

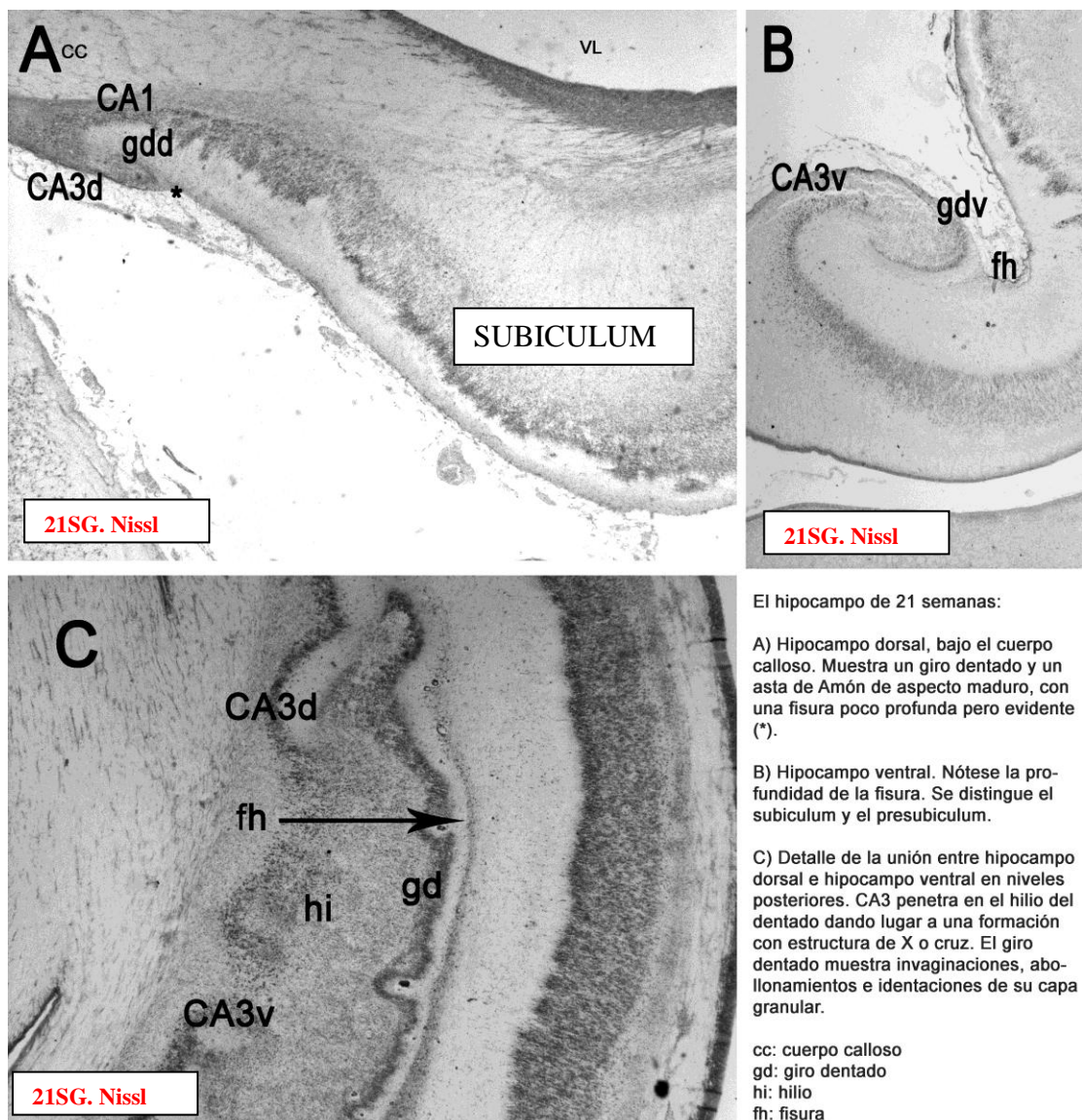


Figura 53: Secciones teñidas con Nissl del hipocampo dorsal (53.A), la cola del hipocampo ventral (53.B) y la unión entre hipocampo dorsal y ventral o cruz del hipocampo (53.C). gd: giro dentado. Gdd: giro dentado dorsal, gdv: giro dentado ventral; hi: hilio; fh: fisura del hipocampo; cc: cuerpo calloso

I. 8.El final del segundo trimestre. Perspectivas del tercer trimestre.

En el HC de 25 SG la principal característica es la ausencia de un HC d anterior (figura 54 y 55). En niveles supracallosos es posible identificar un *induseum griseum* (figura 56, A) en continuidad con la corteza cingular.

En los niveles más posteriores se pueden observar los últimos restos de la confluencia entre ambos HC, que coinciden con la antigua “cruz del hipocampo” y la zona donde el GD era una estructura continua y cilíndrica a las 13 SG (figura 54 y 56, B). El antiguo GD primordial con forma de cilindro o “salchicha” se ha desarrollado en un gran GD con un hilio que abarca desde la región más ventral hasta el área inmediatamente subcallosa, donde forma la *fasciola cinerea* (figura 54). Esta *fasciola cinerea* contiene, por tanto, un resto de la matriz secundaria dorsal (figura 55, B). En el hilio se observan múltiples células granulares PCNA+ correspondientes con una matriz terciaria (figura 55, A). Aunque no parece guardar continuidad con CA1 ventral, en este resto de la confluencia entre HC d y HC v aún se puede observar un fragmento dorsal de CA3, que en secciones levemente más posteriores se dispone también inmediatamente bajo el cuerpo calloso, formando parte del extremo ventral de la *fasciola cinerea* (figura 54 y 56, C y D). Las secciones coronales posteriores a este nivel muestran un asta de Amón de morfología anular progresivamente de menor diámetro (figura 56, B), lo que sugiere que el cabo posterior del asta de Amón es también un fondo de saco.

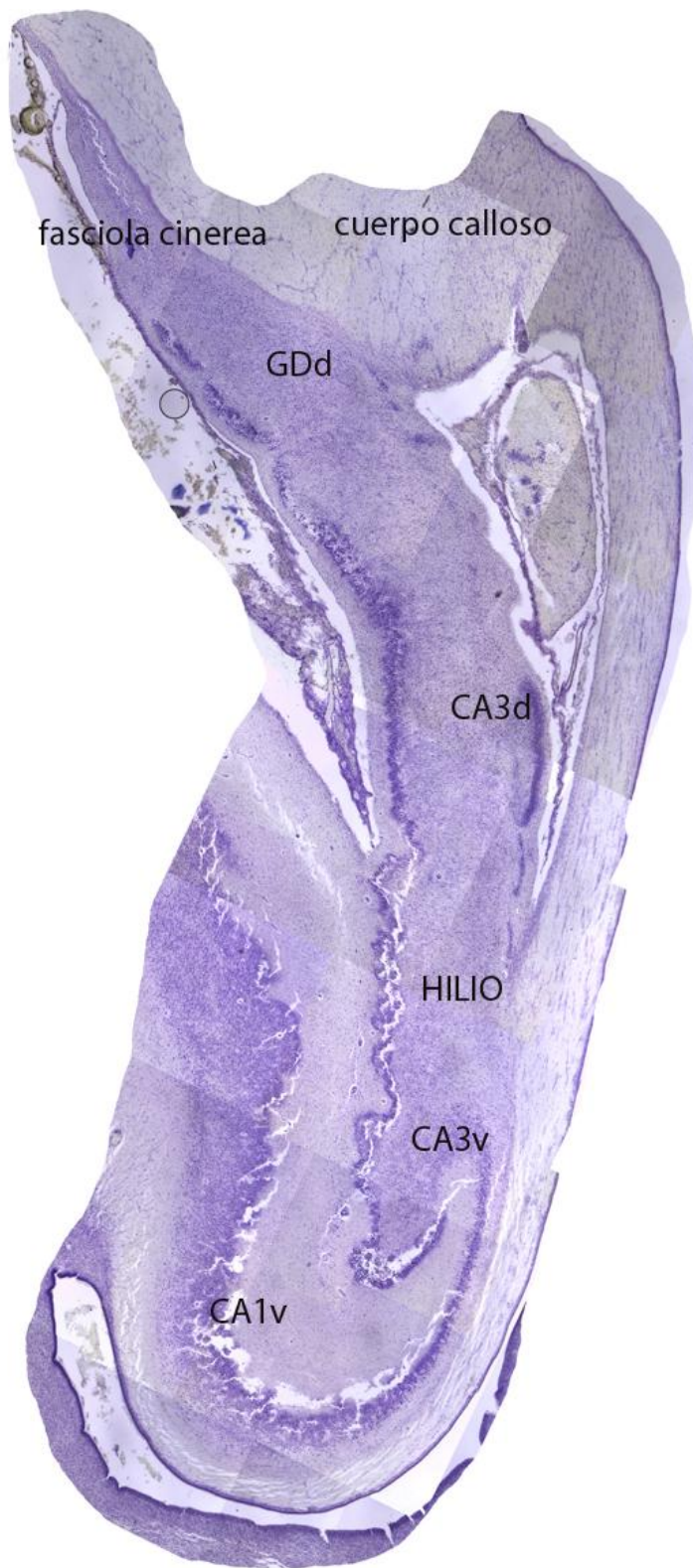


Figura 54: La unión entre HC d e HC v a las 21 SG, con Nissl. Se observa la antigua cruz del hipocampo y la unión entre HC vy fasciola cinérea. GD d: giro dentado dorsal; GD v: giro dentado ventral

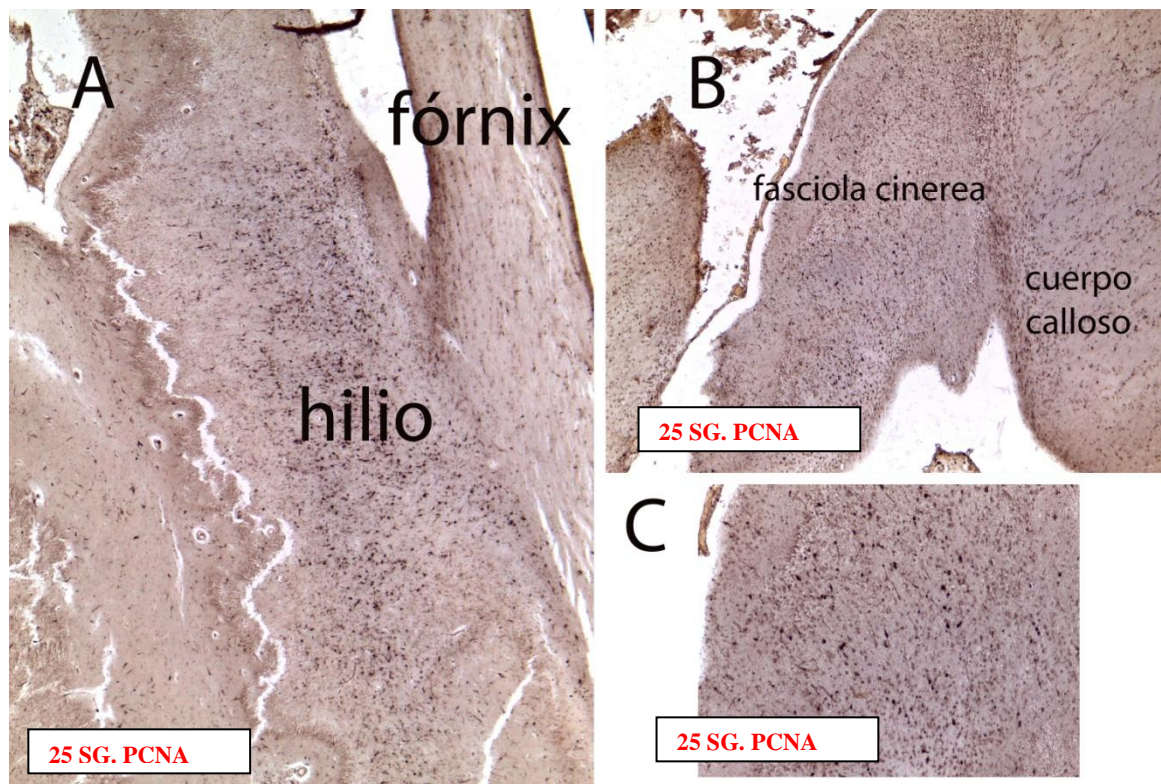


Figura 55: La unión entre HC d e HC v a las 21 SG, con PCNA, se observa la persistencia de tercera matriz del dentado en el hilio dela cruz (55 A) y el extremo subcalloso del hilio, que se encuentra en la fasciola cinérea (55 B y C) y por lo tanto en el antiguo HC d.

Así, podemos establecer un paralelismo entre las regiones hipocampales descritas al final del primer trimestre y las que se aprecian a finales del segundo, tras los numerosos cambios sufridos durante el mismo (ver Tabla 7 y esquema 3).

Primer Trimestre	Segundo trimestre
Hipocampo precomisural	Atrofia/ Incorporación Septum y tenia tecta
Hipocampo dorsal anterior	Induseum griseum
Hipocampo dorsal posterior	Fasciola cinerea
Cruz del hipocampo (unión entre hipocampo dorsal y ventral)	Unión entre fasciola cinerea e hipocampo ventral
Hipocampo ventral	Cola del hipocampo (posterior)
	Cabeza del hipocampo (anterior)

Tabla 7. Evolución de las regiones hipocampales entre las 13 SG y las 25 SG

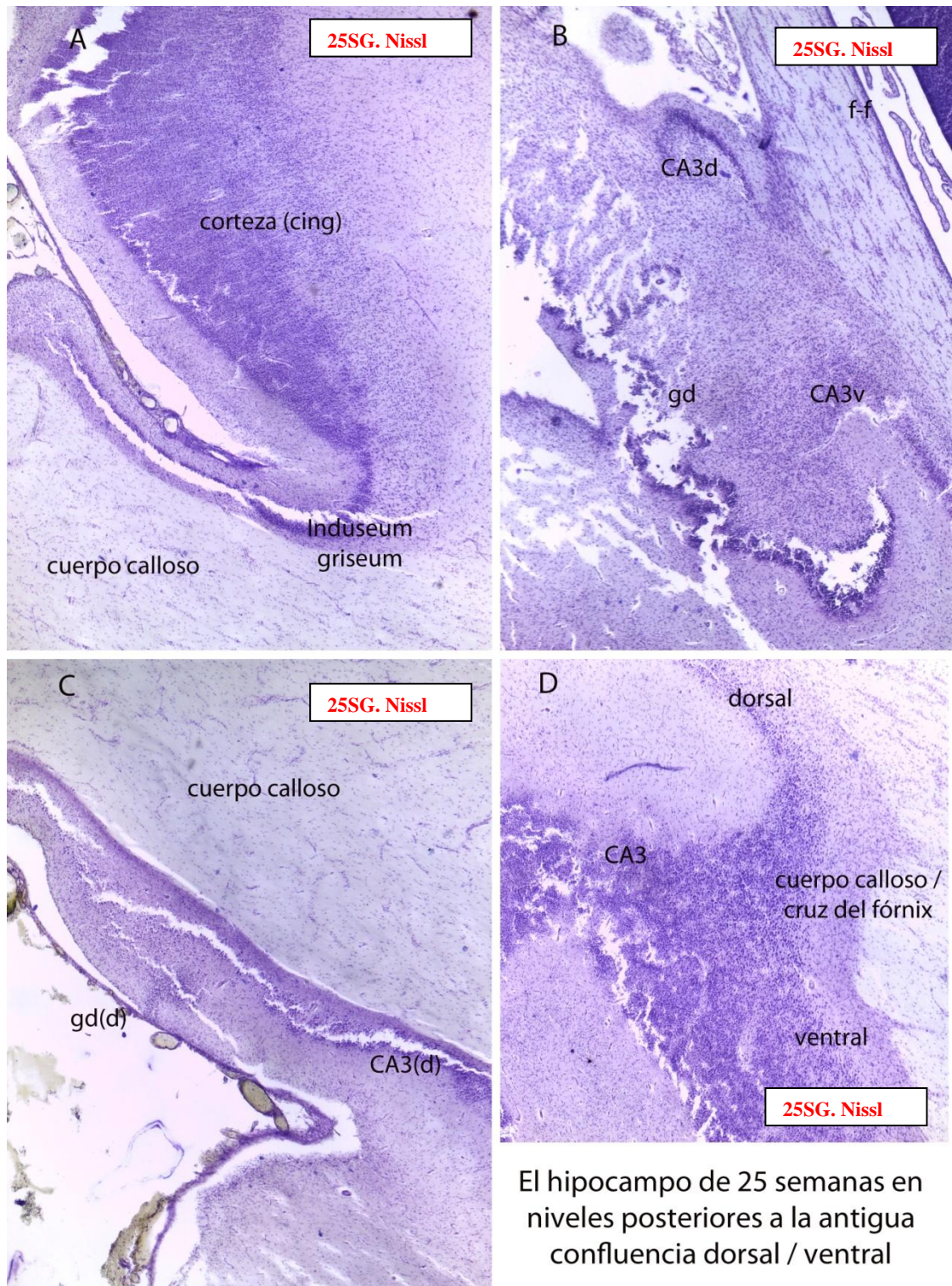


Figura 56: La unión entre induseum griseum y corteza cingular (56.A), la fasciola cinérea (56.C) y los niveles posteriores de la antigua cruz del HC (56.B y D), unión entre HC d e HC v a las 25 SG, con Nissl. Se observa la antigua cruz del hipocampo y la unión entre HC vy fasciola cinérea. GD d: giro dentado dorsal; GD v: giro dentado ventral; f-f: fimbria- fórnix



Esquema 3: Esquema de las regiones hipocampales presentes a finales del segundo trimestre

Aunque en nuestro material no encontramos evidencia de la persistencia de una formación cruciforme en el HC posterior más allá de las 25 semanas, con el HC d reducido a *induseum griseum* y *fasciola cinerea*, es posible que en algunos individuos esta estructura persista hasta el período postnatal , tal y como podemos observar en ciertas colecciones de referencia (Allen Brain Atlas: www.brain-map.org, secciones 66 a 71, en la figura 57)



Figura 57: Imagen de un atlas de referencia mostrando una estructura cruciforme en un hipocampo adulto, en la unión entre HC d e HC v

Hacia el final del embarazo, el HC irá ganando en complejidad en su porción ventral, con un mayor crecimiento y complicación del GD junto una progresiva girificación del mismo, como se ejemplifica en esta imagen del polo uncal del HC de un mortinato de 36 SG (figura 58).

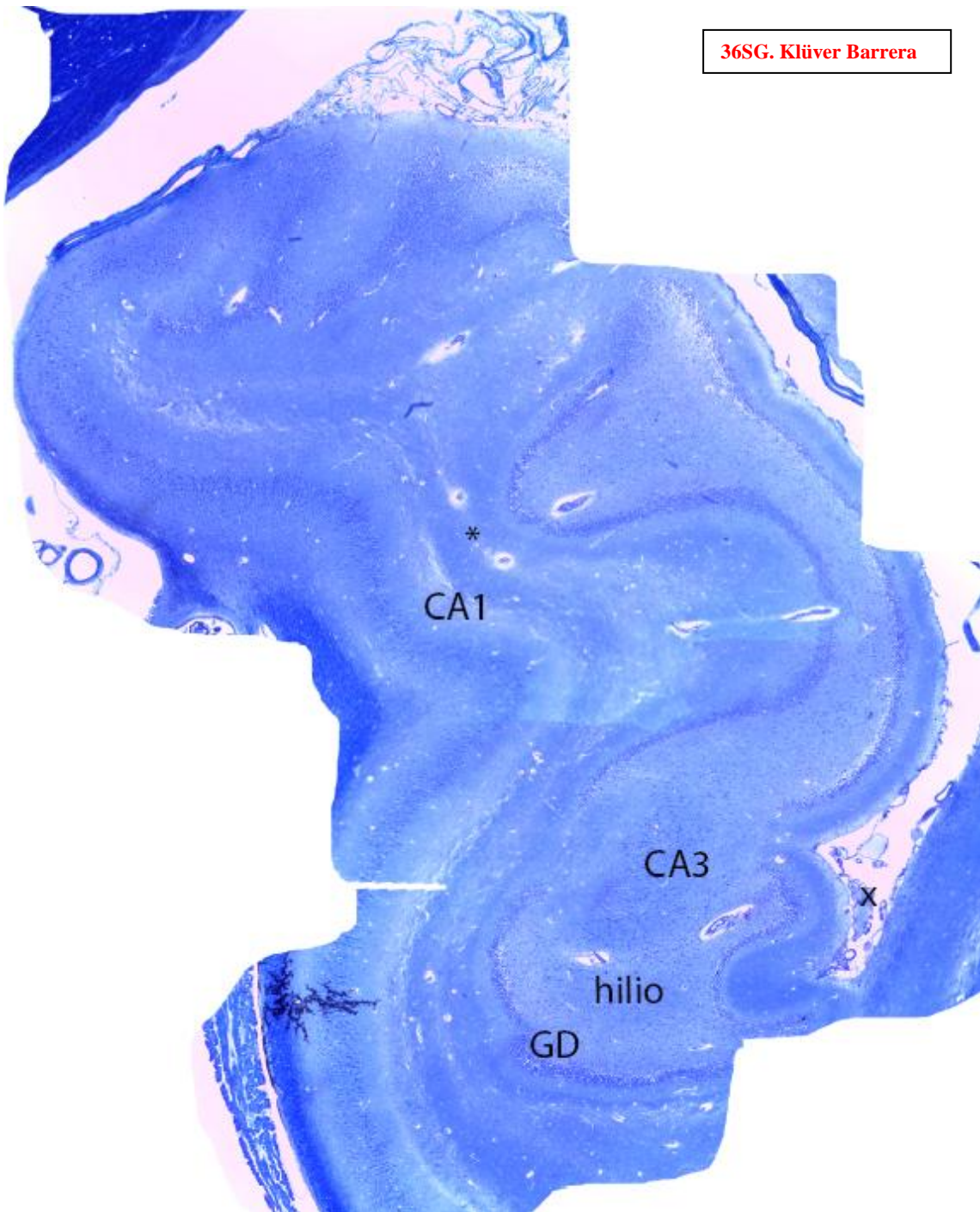


Figura 58: Imagen del polo uncal de un hipocampo de 36 SG, mostrando un gran giro dentado superficial que limita con la fisura uncal. *: fisura del HC

X. RECAPITULACIÓN DEL DESARROLLO DEL HIPOCAMPO HUMANO DURANTE EL PRIMER TRIMESTRE

xi. El desarrollo del giro dentado a finales del primer trimestre.

Entre las 12-13 SG se produce un cambio de comportamiento de la estructuras hipocampales: aunque la zona proliferativa mantiene su actividad (PCNA). En los niveles más anteriores del HC, donde no existe fimbria, no es posible observar actividad proliferativa más allá de la zona subventricular, lo que indica ausencia de formación del GD. En cambio, en los niveles dorsales intermedios es posible identificar un *dentate notch* profundo, con una actividad en la zona ventricular algo disminuida con respecto a edades previas (figura 59). En esta zona del HC d no se observa una corriente migratoria unificada dirigiéndose a una posición subpial. En cambio, en niveles dorsales posteriores, se observa una corriente masiva de células que parten de la zona proliferativa hacia la pia atravesando siguiendo la frontera entre el HC y el glioepitelio fimbrial (figura 60). Estas células en migración y proliferación constituyen el inicio de la segunda matriz de crecimiento del GD, que se mantendrá durante, al menos, el primer tercio de la gestación. A las 12SG, primera vez en la ontogénesis del hipocampo, se detectan células que expresa Prox -1 (figura 61, B y D), un factor de transcripción considerado propio de las neuronas granulares del GD, tanto recién nacidas como maduras (Karalay et al, 2011). Estas células se encuentran en la zona subpial, coincidiendo con la horizontalización de la corriente migratoria PCNA + (figura 61, A y C). Este es el primer indicio de la presencia de neuronas granulares en el GD naciente. Ocupan una zona similar al de las células pioneras CR + que permiten identificar el primordio del GD en estas edades, pero su extensión es muy inferior. Esto sugiere que las primeras células CR + son de naturaleza y origen diferente a la de los granos del giro dentado.

En el HC v (figura 61, C y D) se repite el fenómeno, aunque no es posible identificar el *dentate notch* en ninguno de los niveles. La presencia de células en migración PCNA +

desde la zona proliferativa hasta la zona subpial es también una característica en el rudimento hipocampal ventral en estas edades, aunque aparentemente de menor cuantía que en la contraparte dorsal. No se observa una disposición columnar de las células en migración. Esta corriente de células en migración y proliferación, que se desplazan de zona ventricular a zona subpial, son análogas a las que Altman y Bayer describieron el HC d de la rata y denominaron segunda matriz de crecimiento del dentado.

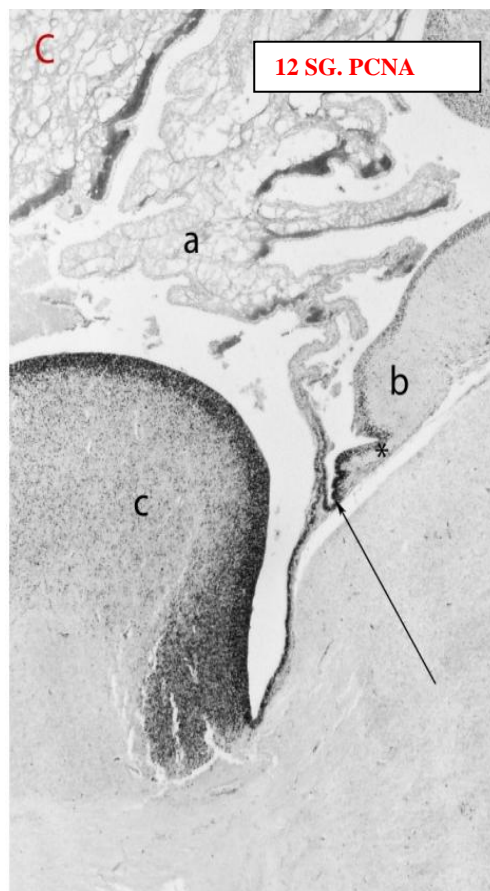


Figura 59: HC d posterior (59.C) con PCNA. (a) Fimbria y el surco tálamo estriatal. Se aprecia un gliopitellio fimbrial (b) con notch (*). C: eminencia ganglionar.



Figura 60 (izquierda): la migración del giro dentado (camino de flechas) en el hipocampo dorsal coincide con la presencia de una fimbria y un plexo coroideo

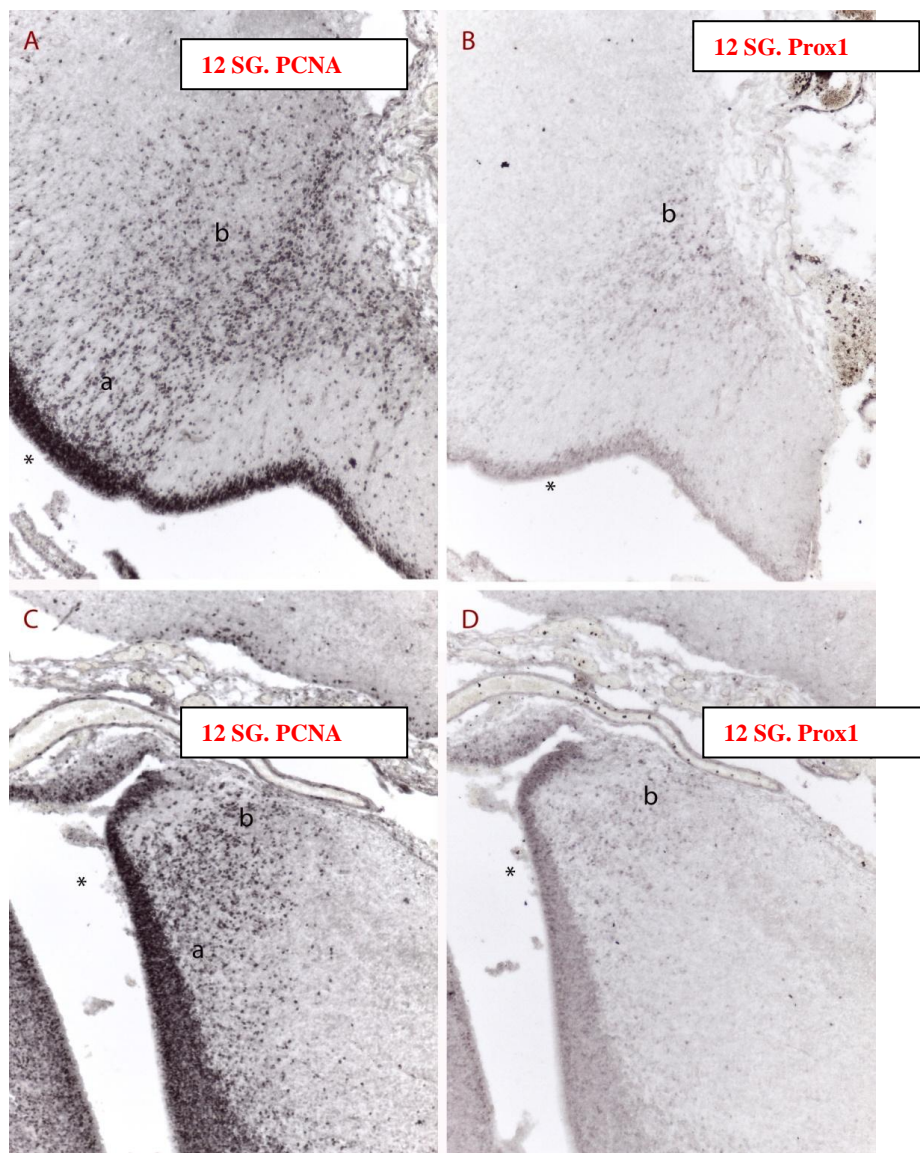


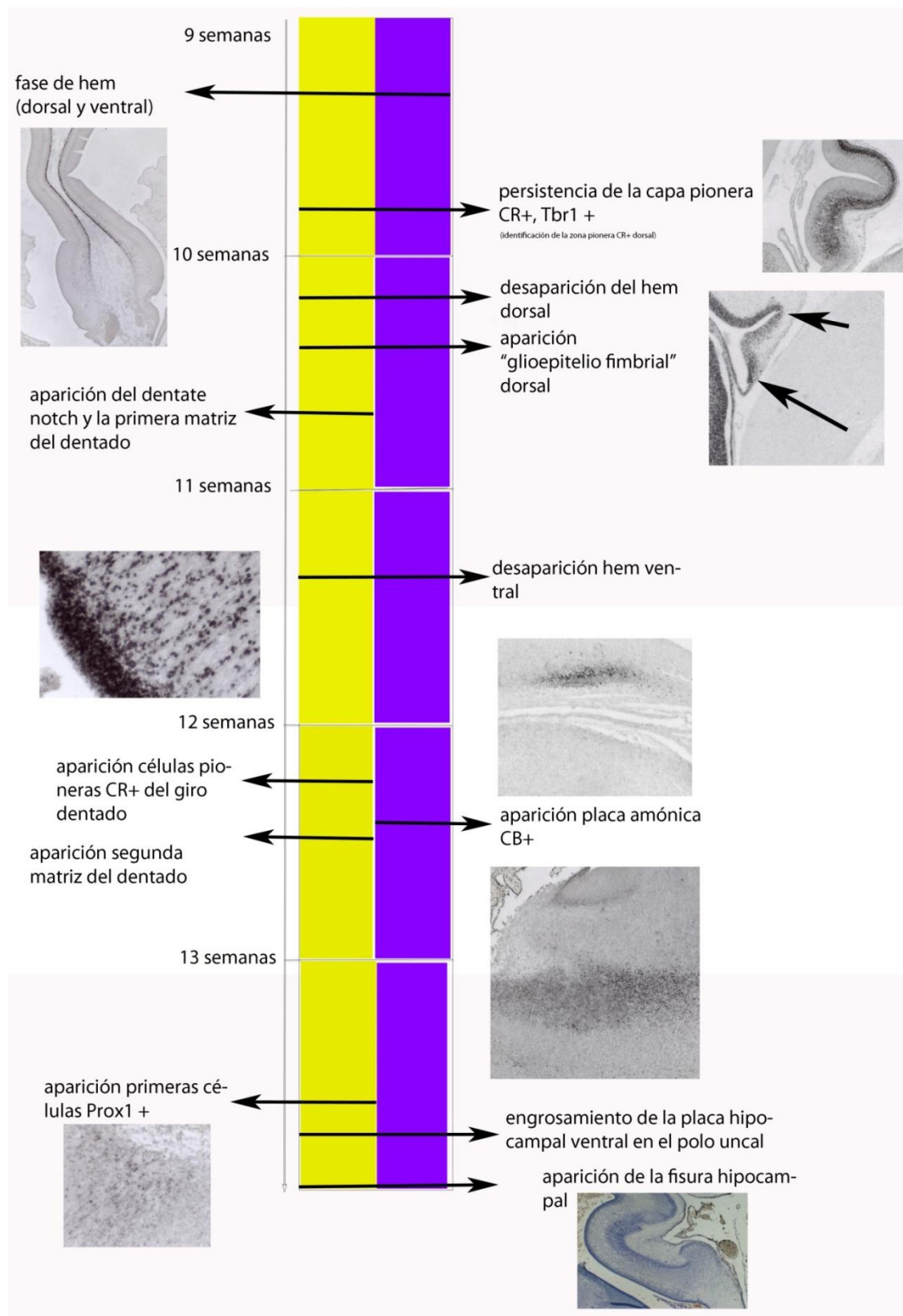
Figura 61: La segunda matriz del dentado en el hipocampo dorsal (61 A y B) y ventral (61 C y D) con PCNA (61 A y C) y prox 1 (61 B y D). Desde la primera matriz (*) se desprende una corriente de células que en primer lugar adopta disposición parafimbrial (a) y después alcanza la zona subyacente a la superficie pial (b), en donde aparece una débil inmunorreacción Prox1 +

Así, al final de la decimotercera semana del desarrollo embrionario del HC, se pueden diferenciar cuatro regiones hipocampales en dirección rostro caudal (ver Tabla 7):

1. **El hipocampo precomisural:** carece completamente de primordio del GD y conexión con los plexos coroideos. Su único componente reconocible es una placa amónica CB+. Se continúa en sentido ventral con el *septum* y en dirección rostral con la *tenia tecta*. (Bayer y Altman, 2005). El límite posterior de esta región del HC en formación se encuentra en niveles posteriores al agujero de Monro, en los que comienza a identificarse un esbozo de fimbria.
2. **Hipocampo dorsal anterior:** Existe una placa amónica CB+ que se continúa con un primordio del giro dentado CR +. Este a su vez conecta con la fimbria y el plexo coroideo. El HC d anterior se define por la presencia precoz de un *notch* y por la presencia de una matriz del dentado poco desarrollada.
3. **Hipocampo dorsal posterior:** En estos niveles el *notch* es muy poco perceptible y, sin embargo, la corriente migratoria PCNA+ que nos permite identificar a las matrices de crecimiento del dentado (especialmente la segunda matriz) alcanza su máximo desarrollo. En HC d la fimbria conecta con la fimbria del HC v y los plexos coroideos mediante una lámina de conexión intercoroidea intensamente PCNA+.
4. **Hipocampo ventral:** Existe una matriz de proliferación del dentado fácilmente identificable, aunque de menor desarrollo que la observada en el HC d posterior. En esta región ventral se encuentra la eminencia hipocampal. Atendiendo a su evolución posterior, puede subdividirse en una región anterior (en la que se encuentra la citada eminencia hipocampal) y una posterior.

xii. Esquemas resumen del desarrollo del hipocampo entre la novena y la décimo tercera (9-13SG) semana del desarrollo intrauterino.

Fig 62 (página siguiente). En resumen, entre las 9SG y las 13SG del desarrollo intrauterino se produce la transformación del CH en el conjunto hipocampo – fimbria / fórnix- plexo coroideo. Durante este período de tiempo, el desarrollo del HC se produce de forma relativamente simétrica en su componente dorsal y su componente ventral, aunque de forma algo más retrasada en este último. A las 9SG aún sigue existiendo un CH con una morfología similar al que se observa durante el desarrollo embrionario. Este hem se continúa inmediatamente en dirección dorsal y ventral con una placa pionera que aún no se ha diferenciado en sus extremos mediales.. A las 12SG el hipocampo, tanto dorsal como ventral, comienza a diferenciarse: a partir de esta edad se puede seguir la placa amónica gracias a la expresión de CB y comienza a formarse un agregado de células CR + en la futura localización del GD. En esta misma edad comienza a observarse una intensa migración desde la zona ventricular hasta la superficie pial en las regiones inmediatamente adyacentes al mencionado gliopitelio fimbrial: esta migración, detectable con PCNA, es el inicio de la migración secundaria del dentado. Estos procesos son comunes al hipocampo dorsal y ventral, y concomitantes. No obstante, en esta edad suelen ser más evidentes en el HC d que en el HCv. En el seno de esta migración aparecen, a las trece semanas, las primeras células Prox1+. A partir de la 13 SG-15SG se hará evidente la profundización de la fisura del hipocampo.



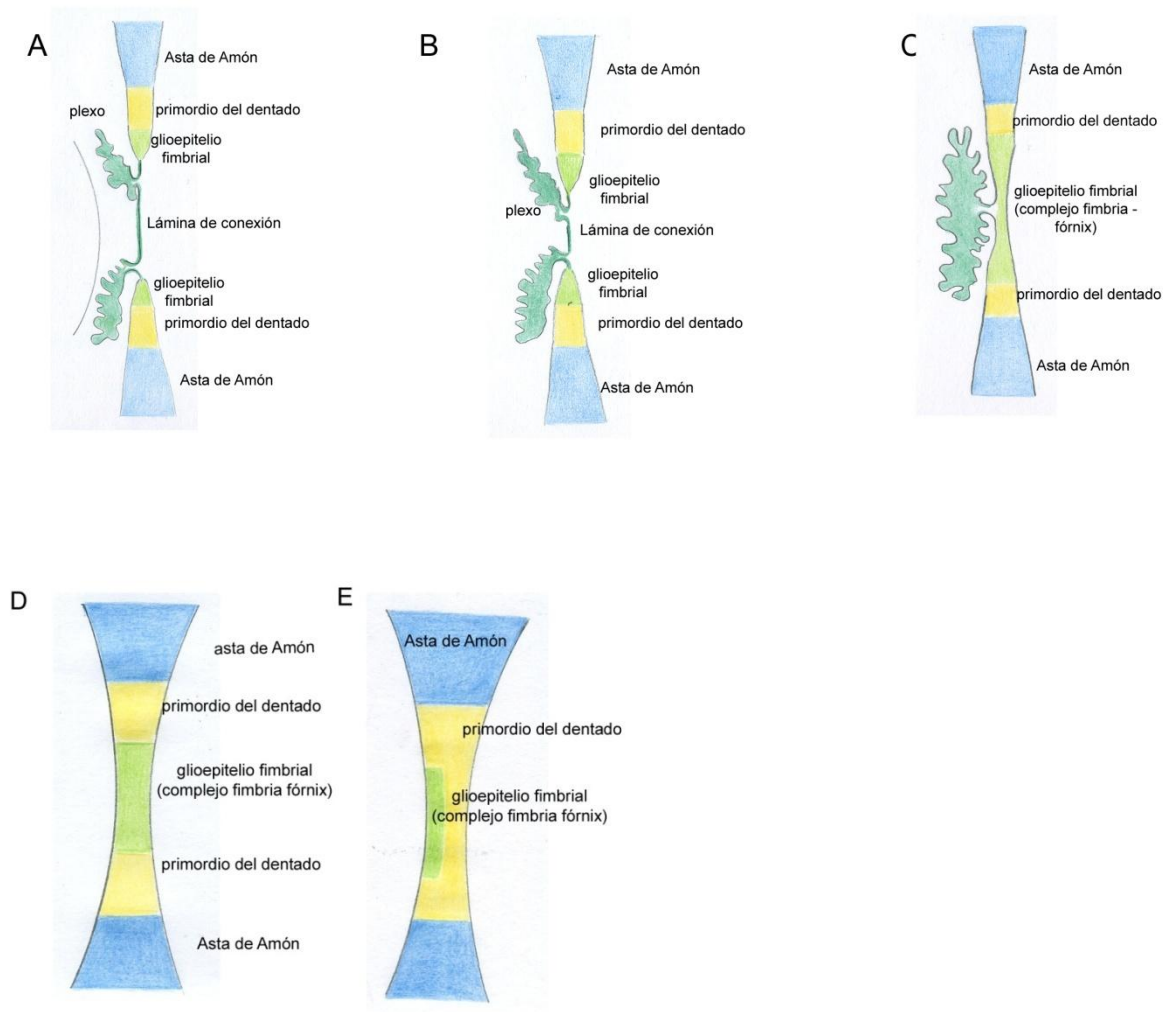


Figura 63. Esquema de la evolución del sistema hipocampo – fimbria – plexo coroideo desde un nivel anterior (63.A) hasta un nivel posterior (63.E) en el que hipocampo dorsal y ventral confluyen y el giro dentado es una estructura continua. En los niveles anteriores el hipocampo dorsal en formación se continúa con el gliepitelio fimbrial, en cuya punta se ancla una de las tenias del plexo coroideo del asta anterior del ventrículo lateral. Los plexos coroideos de las astas anteriores y temporales de los ventrículos laterales quedan comunicados mediante la lámina de conexión. A su vez el plexo coroideo del asta temporal se ancla en la punta del gliepitelio fimbrial del hipocampo ventral. De esta forma, el hipocampo dorsal y el hipocampo ventral están comunicados por la lámina de conexión. (63.A). Conforme se avanza hacia niveles posteriores la lámina de conexión disminuye de extensión (63.B) hasta desaparecer; en este momento se extiende sustancia blanca de la fimbria y el fórnix entre el hipocampo dorsal y el hipocampo ventral (63.C y D). El punto donde se ancla el plexo coroideo (63.C) coincide con el punto donde a las 9 SG se producía la confluencia de cortical hem dorsal y cortical hem ventral (ver figura 28, esquema 2 y figura 31, A)

xiii. Resumen de los principales acontecimientos durante el desarrollo del hipocampo humano

La migración del dentado.

El GD representa un área cortical particular cuya morfogénesis y dinámica celular muestra importantes diferencias que le permiten, entre otras cosas, convertirse en uno de los pocos nichos de neurogénesis adulta. Una de las particularidades de su desarrollo es la presencia de una población celular mitóticamente activa que migra siguiendo una ruta específica y diferente al resto de los componentes corticales. Este proceso está bien definido en modelos murinos, no así en humanos.

La migración del GD comienza a producirse desde el primer momento en el que se puede reconocer un primordio hipocampal. El componente neuroepitelial más próximo al gliopitelio fimbrial muestra una superficie levemente escotada y una densidad algo menor que el adyacente neuroepitelio amónico (figura 64, izquierda arriba). Esta escotadura es el representante humano del *dentate notch* definido en modelos murinos y es el asiento de la **primera matriz del giro dentado**. Se reconoce por primera vez en el HC d a finales de la 10 SG desarrollo y aparece en el Hc v en la 11 SG.

A partir de la 12 SG comienza a desprenderse del neuroepitelio una corriente de células PCNA + que se dirigen hacia la superficie pial del ventrículo y, sobre todo en el HC d, adoptan disposición en forma de filas o columnas, a modo de migración radial. Este es el comienzo de la **segunda matriz del dentado**. Esta organización de la migración se mantiene a lo largo de la primera mitad del grosor del primordio hipocampal, a partir de la cuál estas células en migración se agrupan y se disponen bajo la superficie pia (figura 64, A y C)l. A partir de la 14 SG del desarrollo la región de morfología columnar o radial queda reducida a células aisladas mientras que la población de células de disposición subpial se mantiene con una densidad similar. En la décimosexta semana las células PCNA+ se extienden tanto bajo la piamadre de la superficie como bajo la piamadre de la fisura hipocampal, dibujando así los dos brazos del GD. En los niveles posteriores esta segunda matriz es abundante y densa tanto en su porción dorsal como en su porción ventral. Entre la

16 - 17,5 SG semana una parte de estas células migra en profundidad y se dirige hacia el futuro hilio del dentado (figura 65, B). Esta migración en dirección hiliar constituye el inicio de la **tercera matriz del dentado**, origen de la neurogénesis adulta en el hilio del HC (en la capa subgranular).

Esta tercera matriz no se forma en las regiones dorsales y es más evidente en las regiones ventrales en las que existe una fisura profunda, donde además coexiste con un esqueleto glial de morfología radial. Por tanto, la tercera matriz del dentado se desarrolla en relación con la fisura del HC y el *glial scaffold* del dentado. Más tardíamente se encontrará limitada por la rama infrapiramidal del GD.

En el material de 16 y 17,5 SG la segunda matriz del dentado sufre cambios importantes en las regiones ventrales. En las secciones más anteriores, destinadas a formar la cabeza del HC, la primera matriz mantiene una intensa inmunotinción y se observan múltiples escotaduras PCNA+ en la superficie del neuroepitelio que dan lugar a múltiples corrientes migratorias (figura 65, A). Estas imágenes sugieren la existencia de más de un *notch*, que da lugar a varias matrices secundarias y probablemente este proceso esté en relación con la notable complejidad morfológica de la cabeza del HC.

Mientras, en las regiones dorsales anteriores, donde el HC coexiste con el cuerpo calloso, la segunda matriz persiste aunque reducida a células aisladas. No existe esqueleto glial radial ni fisura del HC ni se desarrolla tercera matriz (figura 64, F y G).

Entre la 17 SG y el final del segundo trimestre del desarrollo intrauterino, la tercera matriz se consolida afincándose definitivamente en el hilio del HC de los niveles anteriores y ventrales. El *notch* permanece visible y activo en este período y aún es posible detectar células aisladas PCNA+ en el antiguo recorrido de la segunda matriz del dentado. La presencia de una tercera matriz parece, por tanto, una característica fundamental en el desarrollo diferencial del HC v (figura 65).

En el feto de 21 SG no se detecta migración del dentado en el polo anterior. La migración secundaria se identifica en niveles en los que existe una fimbria y un plexo coroideo, identificándose incluso varias corrientes de células en secciones

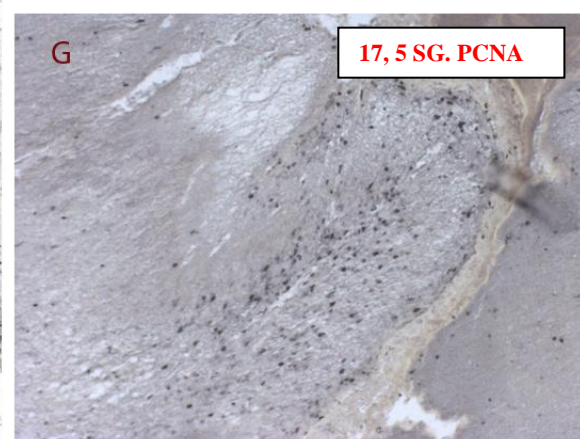
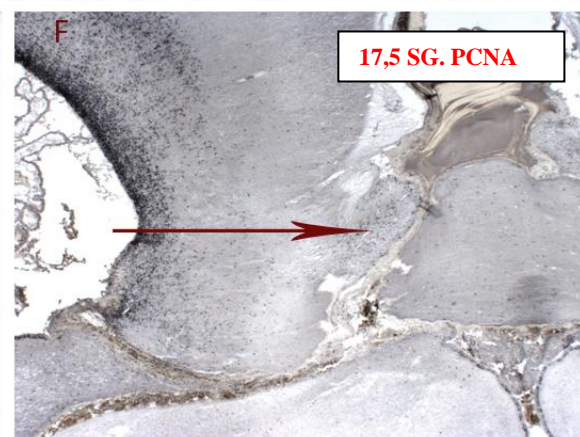
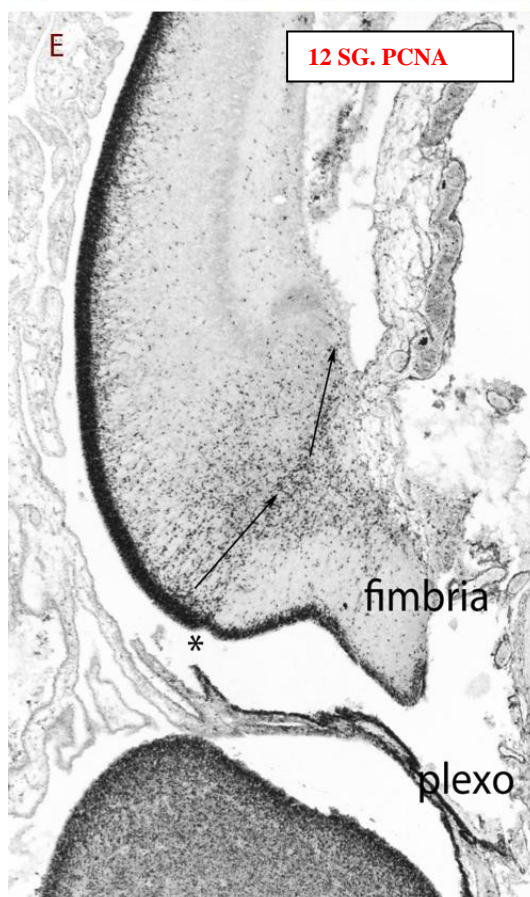
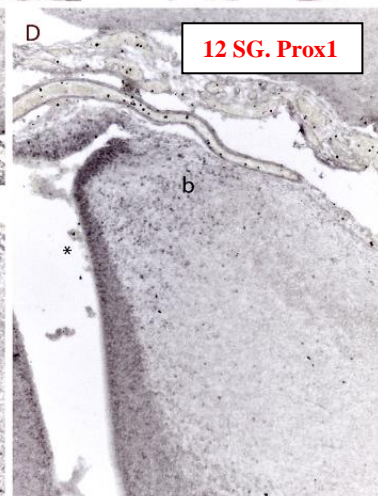
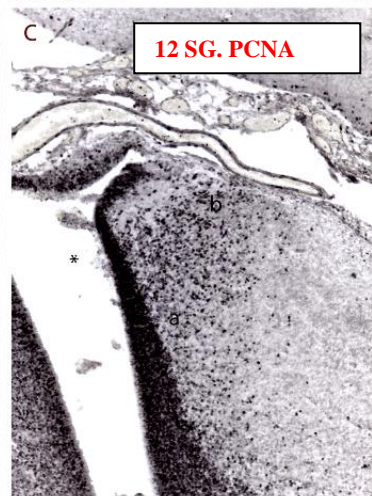
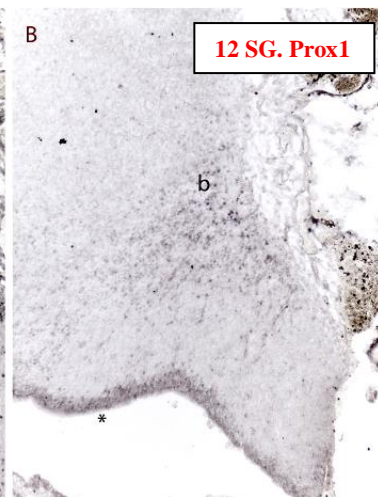
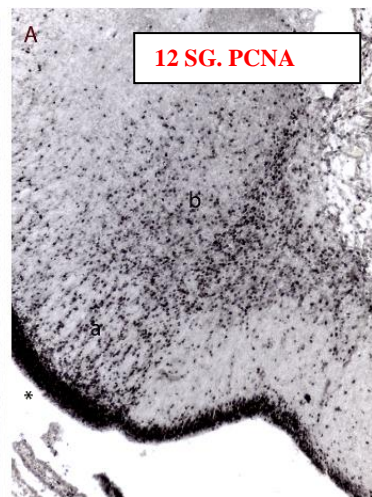
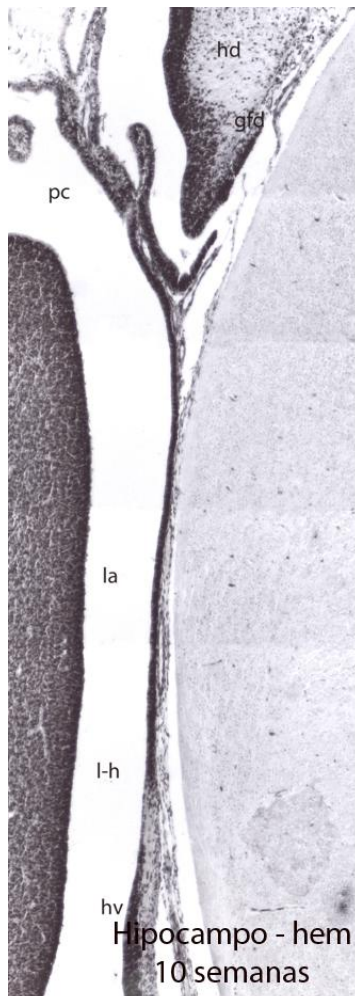
algo más posteriores dentro del propio uncus. No obstante, existe un hilio con numerosas células PCNA+ (figura 66).

Este dato, junto con los obtenidos en 17,5 SG que indican la presencia de múltiples corrientes migratorias en la región uncal y la ausencia de matriz secundaria en las secciones uncales anteriores, indican una migración de precursores neuronales del dentado que se produce en un gradiente postero anterior y tiene lugar a lo largo de la superficie pial fisural.

Por lo tanto, en el ser humano se pueden distinguir varias etapas en el desarrollo del GD, relativamente análogas a las descritas en otros mamíferos.

1. Una **matriz primaria**, es decir, un neuroepitelio primitivo que se dispone en el *dentate notch*. Esta matriz pervive a lo largo del segundo trimestre del desarrollo en el HC v y tiene carácter múltiple en la cabeza del HC.
2. Una **matriz secundaria**, que también es múltiple en la cabeza del HC y que a su vez se divide en dos componentes.
 - a) Un *componente perifimbrial* que representa una migración desde la zona ventricular hacia la piamadre, siguiendo la frontera dentado – fimbrial.
 - b) Un *componente de disposición subpial* que se dirige siguiendo el camino de la fisura del HC.
3. Una **matriz terciaria**, que comienza a desprenderse de la secundaria en la semana dieciséis, es exclusiva del HC v y se mantendrá en el tiempo.

Figura 64 (página siguiente). La evolución de la migración del GD entre el segundo y el tercer trimestre, mostrando la primera matriz cuando esta se encuentra únicamente en el HC d a las 10 SG (64, sin número) y el desarrollo de la matriz secundaria a las 12 SG en el HC d (64.A, B, E-la flecha marca la dirección de la migración desde el *notch* hasta la superficie pial) y el HC v (64.C y D). A las 17,5 SG aún existe algo de matriz secundaria en los restos del HC d en vecindad al cuerpo calloso (64.F y G), la flecha señala la región ampliada. Pc plexo coroideo; hd: hipocampo dorsal; gfd: gliopitelio de la fimbria dorsal; hv: hem ventral; la: lámina de conexión; l-h: unión entre la lámina de conexión y el hem ventral.



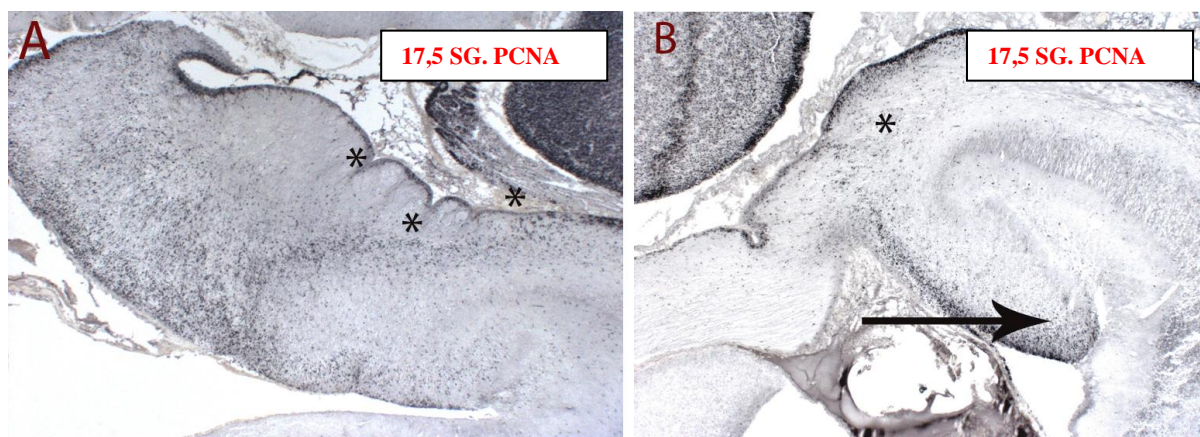


Figura 65 (arriba). La migración del Gd en la cabeza (65.A) y la cola (65.B) del HC v mostrando los múltiples *dentate notch* (*) en la cabeza y las múltiples migraciones secundarias. La flecha señala el hilio del GD.

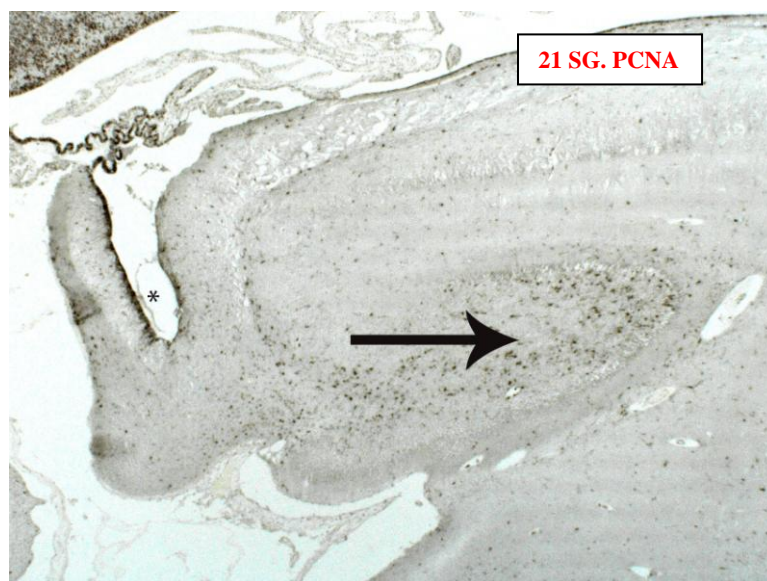


Figura 66 (izquierda). La migración del Gd en la cabeza del HC v mostrando la matriz terciaria en el hilio del GD (flecha)

El desarrollo diferencial del hipocampo dorsal y ventral.

Dada la proliferación de modelos genéticos y electrofisiológicos realizados en el HC d murino y los datos que indican una diferenciación funcional y genética entre las regiones dorsales y ventrales del HC, es fundamental detallar los procesos que condicionan que el HC humano sea una estructura eminentemente ventral, con una contraparte dorsal prácticamente atrófica.

El HC d aparece con una cierta antelación frente al HC v. A las diez semanas del desarrollo aún existe un cortical hem en la posición del HC v unido mediante una lámina de tejido coroideo al primordio HC d. Entre la undécima y la décimo cuarta semana del desarrollo ambos HC son estructuras simétricas, con una placa amónica CB+ y una región dentada CR+, existiendo en ambas una migración secundaria del GD bien desarrollada. En niveles posteriores se puede observar el primordio del dentado como una estructura única con forma de cilindro o salchicha. Al final de la décimotercera semana la zona de la fisura ventral comienza a tomar forma de profunda escotadura rica en tejido conectivo vascular. En el tejido nervioso adyacente empieza a evidenciarse la presencia de una población de células de gran tamaño que coexpresan p73 y Reelin (neuronas de Cajal Retzius) que es claramente identificable a las 14-15 semanas. En esta zona la invaginación de la superficie es obvia en el HC v y muy leve en el HC d. Además, esta profundización de la fisura se acompaña de la proliferación de vasos prominentes que aparentemente presionan en la fisura. En este punto comienzan a hacerse visible las conexiones vasculares previamente señaladas entre las arterias de la fisura que van a irrigar al HC y las que alimentan a los plexos coroideos. Entre la semana 14 y las 16 SG el desarrollo del HC v prosigue. Se observan dos fenómenos aparentemente esenciales. Por una parte, en la región donde en edades previas se observaba una fisura más profunda y alambicada y prominentes sistemas anastomóticos, la morfología del HC se complica: la superficie aparece abollonada y se desarrollan múltiples corrientes migratorias de neuronas granulares del dentado. Por otro lado, se consolida la presencia de un esqueleto glial radial vimentina + en el hilio del GD del HC v que no está presente en el HCd (aunque existe glía vimentina +).

En la décimoséptima semana la complejidad de la cabeza del HC sigue en aumento, mientras que en la cola podemos distinguir con mayor facilidad la relación entre el asta de Amón y el GD. Mientras tanto, el HC d constituye ya una estructura prácticamente atrófica en sus regiones anteriores, que nunca ha llegado a desarrollar una fisura profunda, ni un *scaffold* glial radial ni una tercera matriz proliferativa del dentado. A lo largo de las semanas posteriores, la mayor parte del mismo se verá sustituido por el cuerpo calloso.

Así, podemos identificar tres factores que subyacen bajo el dramático desarrollo del HC v y el escaso papel que juega el HC d en el humano:

- 1) El desarrollo de una prominente vascularización en la fisura ventral, que se acompaña de agregados de células de Cajal Retzius. Esta gran vascularización parece jugar un papel en el gran desarrollo de la misma y está ausente del HC d
- 2) La ausencia de un esqueleto glial radial (*scaffold*) en el HC d.
- 3) La ausencia de una tercera matriz del GD dorsal

A partir de la semana 17,5, y de forma particular en las últimas semanas del segundo trimestre (21 a 24) se define una segunda fase en el desarrollo del HC v, a raíz del enorme crecimiento de la cabeza del HC. La cabeza del HC surge en las regiones en las que, a finales del primer trimestre, la placa hipocampal se encuentra notablemente ensanchada a modo de eminencia. El extremo uncal de la cabeza del HC se continúa con el núcleo cortical de la amígdala a través de un área conocida como HATA, que conecta con el asta de Amón. En estos niveles no existe conexión entre el asta de Amón y el complejo fimbria- plexo coroideo. El asta de Amón en su cabo anterior muestra una sección coronal de forma anular, sin que sea posible identificar CA3 ni GD, y se continúa con un *subiculum* y un *presubiculum*, identificable por primera vez en esta edad por la morfología glomerular característica de su capa principal. Conforme se avanza hacia niveles posteriores, se observa un GD de morfología anular que contiene en su interior una ramificación de CA3. Estas secciones corresponden con una morfología sacular tanto del asta de Amón como del GD en los extremos uncales. No es posible identificar una migración del GD hasta niveles muchos más posteriores de la propia cabeza del HC, en los que la aparición de la fimbria y el plexo coroideo se asocian a la aparición de

múltiples *notchs* de los que surgen, a las 17,5 semanas, múltiples corrientes de células PCNA+ . Asumiendo la vinculación entre el GD y el complejo fimbria – plexo coroideo, las células del dentado en migración parecen invadir una zona de ensanchamiento de la placa cortical – amónica desde un origen posterior. La magnitud de las corrientes migratorias en la cabeza del HC es mucho más intensa que en otras regiones del HC, lo que contribuye a la gran girificación de la misma, que comienza a observarse a las 21 SG (figura 67), continúa en el material de la semana 24-25 y se hace evidente a finales del tercer trimestre. Esta girificación es una característica del humano, y en colecciones de referencia es un rasgo cuya presencia se encuentra limitada (aunque en mucho menor medida que en el humano) a ciertas especies de primates antropomorfos (como se puede observar en colecciones de referencia como brainmuseum.org, figura 68)

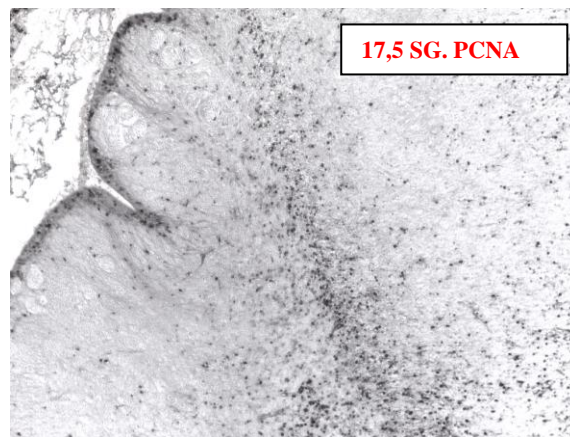


Figura 67: Detalle de la segunda matriz del GD con PCNA.

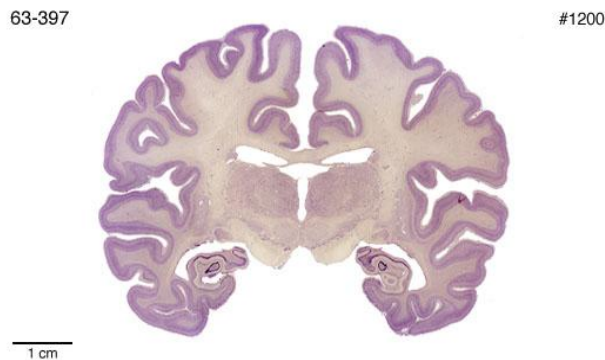


Figura 68: cabeza del hipocampo girificada de *Pan Troglodytes* (brainmuseum.org)

II. EL HIPOCAMPO DEL RATÓN MUTANTE ADULTO p73 COMO MODELO DE HIPOCAMPO SIN FISURA.

Uno de los hechos que parecen determinar de forma decisiva el desarrollo ulterior del HC en el ser humano es la formación de la fisura del HC y, particularmente, su extensión en el polo ventral. A partir del desarrollo de la fisura ventral el HC v aumenta en tamaño y complejidad, un fenómeno que alcanza su cénit en la cabeza del HC, donde asistimos a un aumento conjunto de la complejidad de la fisura y el GD. La presencia de una superficie pial fisural y una zona marginal poblada por neuronas de Cajal Retzius parece fundamental para el desarrollo de la segunda y tercera matriz del GD. Por esto consideramos útil para esclarecer el papel de la fisura del HC el estudio pormenorizado de los efectos de la falta de la misma. Para ello procedemos al estudio del ratón mutante adulto carente de p73, un modelo animal cuyo HC se desarrolla en ausencia de fisura sin mostrar anomalías asociadas en la laminación cortical en conjunto con una grave anomalía en el desarrollo del HC. El estudio de estos animales cobra un mayor interés atendiendo a la íntima relación entre las neuronas de Cajal Retzius, ausentes en el mismo y normalmente presentes en la zona subpial de la fisura, y el cortical hem de donde se originan.

Aunque el ratón mutante carente de p73 es un modelo potencialmente válido para el estudio de las consecuencias de la ausencia de fisura en la dinámica de las distintas poblaciones celulares, es necesario no perder de vista las múltiples limitaciones de los modelos murinos. El desarrollo diferencial de la cabeza del HC no se produce en ellos, como tampoco la girificación del HC ni la desaparición del HC d. Además, el sistema de conexiones entre el HC y la corteza entorrinal difiere entre los distintos mamíferos. Un factor añadido que dificulta la comparabilidad entre modelos murinos y el humano es la escasa afinidad filogenética entre ambos. Desde el punto de vista estructural, la lisencefalia de los murinos actuales parece haberse producido por “involución” desde un precursor girencefálico (Kelava et al, 2013) lo cuál aleja aún más al ratón del hombre. No obstante, a pesar de las limitaciones, consideramos que el estudio de un HC sin completa los datos sobre la importancia de la misma, a la espera de poder profundizar en el desarrollo embrionario de los ratones p73 -/-.

II. 1. Análisis morfológico del hipocampo del ratón adulto *p73* ^{-/-}

II. 1. A. ESTRUCTURA ANATÓMICA.

La característica más llamativa de manera global del HC mutante es la diferenciación entre una zona anterior, septal, severamente hipoplásica, en la que el HC muestra una reducción de anchura en sentido medio-lateral que coincide con la presencia de ventrículos anormalmente dilatados a ese nivel (figura 69, A). Por el contrario, el HC muestra en niveles posteriores un aumento del diámetro medio-lateral en relación con el de la totalidad del hemisferio (figura 69. B). En todos los niveles del HC se encuentra una superficie lateral del asta de Amón anómala, en la que se aprecian escotaduras profundas a modo de circunvoluciones (figura 70). Dichas escotaduras son más llamativas a nivel posterior, aunque también están presentes en el hipocampo septal. También se aprecia con bastante claridad la fusión entre la capa molecular del GD y el *stratum lacunosum moleculare* del asta de Amón (figura 69)

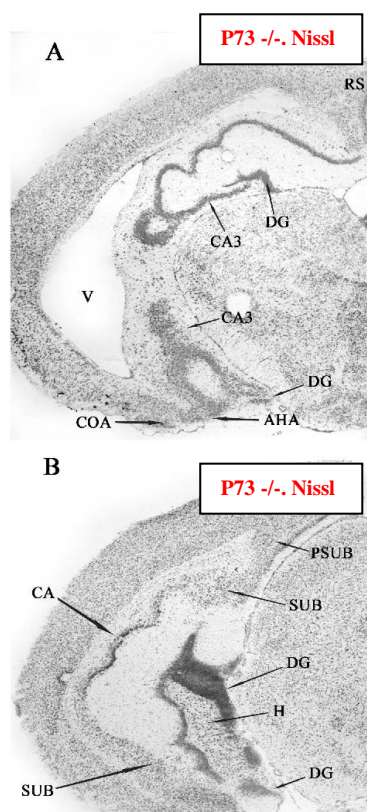


Fig69: El hipocampo del mutante. DG. Giro dentado; PSUB: presubiculum; SUB: subiculum; H: hilio; CA: asta de Amón; RS: corteza retrosplenial. En la figura 69. A se observa un nivel próximo a la cruz del hipocampo. En la figura 69. B se observa un nivel posterior a la misma.

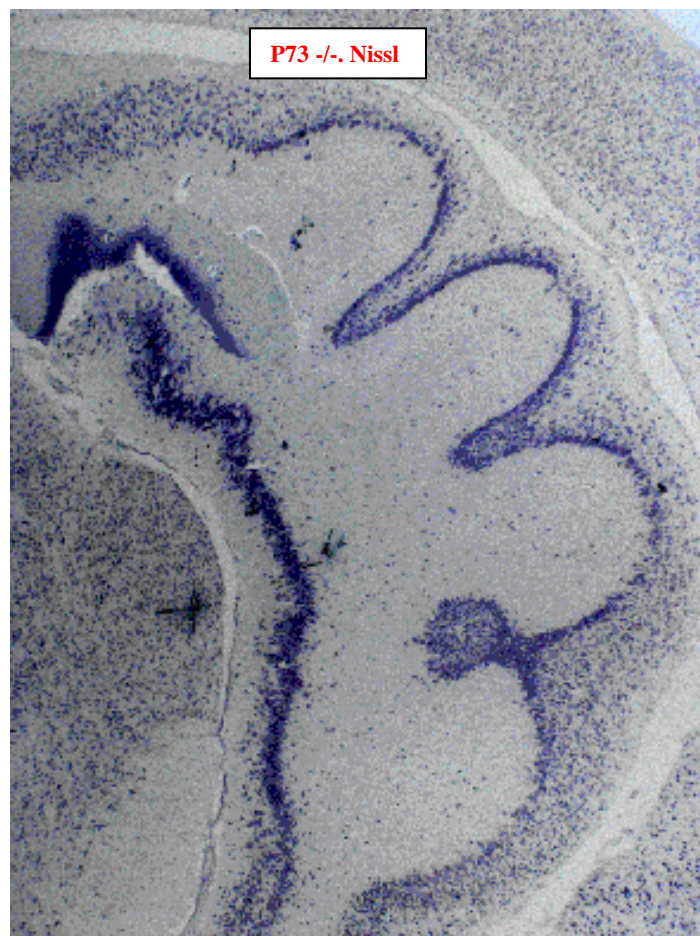


Figura 70. Lobulaciones del hipocampo p73 $-/-$. Se advierten los múltiples puntos de arranque de CA2

El asta de Amón.

CA1: CA1 mantiene conservada su histología y su organización citoarquitectónica, aunque en determinados puntos de su recorrido la capa piramidal parece desorganizarse. Es en CA1 en donde se hacen más evidentes las lobulaciones antes mencionadas (figura 70). En algunos puntos de estas lobulaciones la capa piramidal profundiza hasta casi contactar con CA3.

CA3: El área CA3 mantiene igualmente una capa de neuronas piramidales reconocible, aunque muestra una relación alterada con el GD. En las secciones de la zona de transición entre el HC d e HC v se observa un CA3 con un largo recorrido subpial y una

extensión superior a la que se puede observar en niveles equivalentes de los controles (figura 71).

CA2: Una de las malformaciones más llamativas se encuentra en el área CA2. CA2 es la transición entre CA3 y CA1 definida por Lorente de Nó (1934) y la zona donde normalmente mejor se aprecia, según nuestros resultados, es a nivel de la transición entre HC d y HC v donde adopta una disposición cruciforme. En el ratón p73^{-/-} la disposición normal se pierde y es sustituida por formaciones anulares aberrantes que parecen tener varios puntos de arranque (figura 70 y 71). En algunos individuos no se puede establecer con claridad una unión entre el HC d e HC v. En otros la unión está presente, pero adoptando la morfología aberrante previamente descrita.

CA4 / hilio. Las células piramidales de CA4, que corresponden con las células musgosas de la literatura más reciente (Amaral et al, 1978) aparentemente se encuentran conservadas en el hilio del GD.

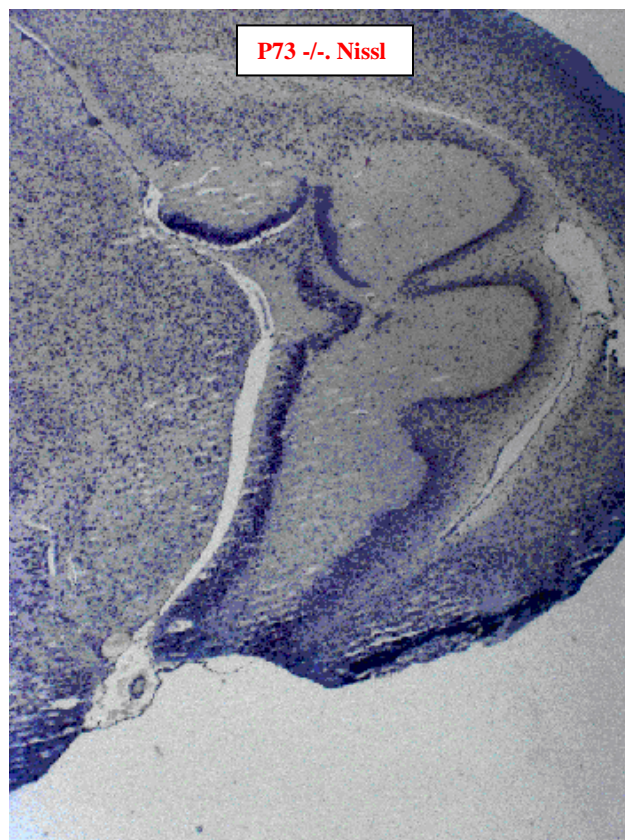


Figura 71:: Ectopias del giro dentado, lobulaciones del hipocampo y giro dentado perforado por el subiculum.
Se observa la elongación de CA3.

Giro dentado.

El GD es otra estructura muy malformada del HC del ratón mutante p73 -/-. Aunque conserva su laminación, a lo largo de la mayor parte de su recorrido muestra una relación alterada con CA3, de manera que no lo “abrazo” en ningún punto de su recorrido, como sucede en condiciones normales. Clásicamente se describe al GD como una estructura en forma de C o V en la que se distingue un brazo infrapiramidal o medial y suprapiramidal o lateral, esa estructura se pierde en el HC mutante **debido a la ausencia del brazo infrapiramidal**. El trayecto del GD es casi completamente adyacente a la superficie pial medial, sin plegarse en dos hojas como hace normalmente (figura 72). En algunas regiones muy anteriores parece formarse un boceto del brazo medial, pero adoptando una angulación anómala y con un recorrido muy corto. En estas regiones, sobre todo en las zonas dorsales, es relativamente frecuente que se pierda la continuidad del GD y se formen contactos directos con el *subiculum*. En ocasiones se identifican grupos de células aislados a modo de focos ectópicos de GD (figura 71). Con respecto a la fisura del HC, que en condiciones normales separa el GD del área CA1 del asta de Amón, no se identifica en las secciones teñidas con violeta de cresilo, como era esperable. Frecuentemente se hace visible la completa aposición de las capas moleculares del GD y asta de Amón. No obstante, debido a defectos mecánicos por el tratamiento de la muestra, se forma una plano de clivaje entre ambas que sigue aproximadamente el camino que debería seguir la fisura del hipocampo, sugiriendo una cierta falta de continuidad o de adherencia en esa interfase. En ningún punto del HC se pueden distinguir láminas de tejido conectivo o vasos que sugieran la presencia de piamadre entre GD y asta de Amón.

Otras regiones

Subiculum: En el *subiculum* se encuentra otra de las malformaciones llamativas en el ratón mutante. La citoarquitectura está distorsionada de forma grosera y se puede apreciar la desorganización sus capas. Además, en varios puntos se forman conexiones que parecen comunicar de forma directa el *subiculum* con el hilio del dentado. Estas conexiones perforan la capa granular del dentado, interrumpiendo su continuidad. (Figura 72)

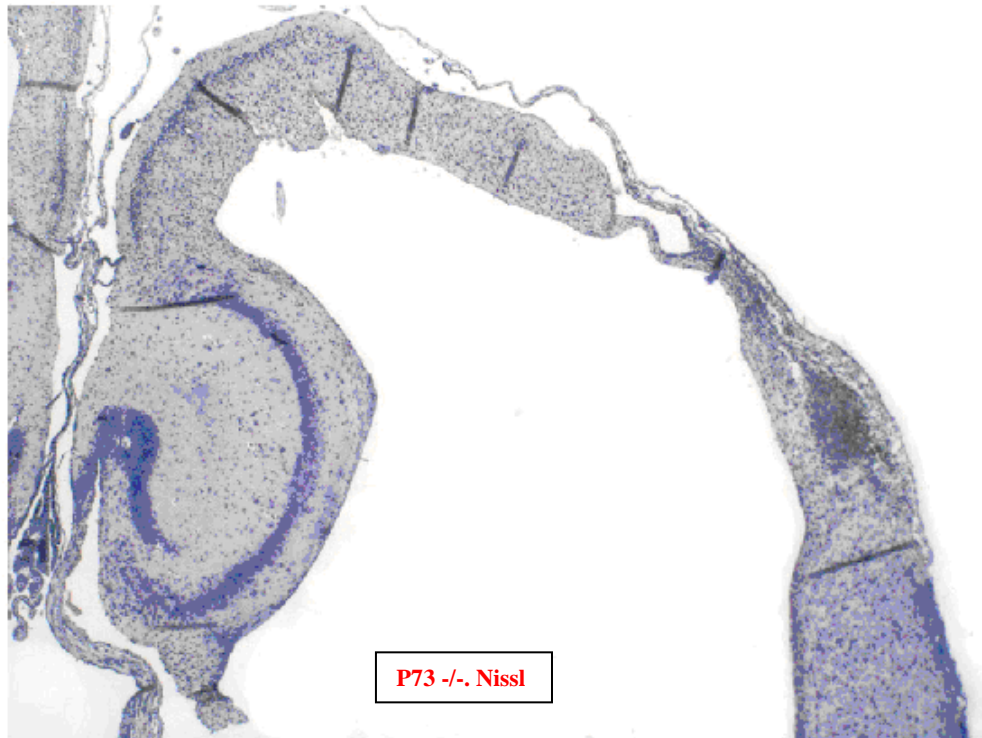


Figura 72: Hipoplasia severa del hipocampo dorsal en un mutante de un mes, acompañada de una gravísima reducción de la corteza cerebral, hemorragias y cicatrices. En esta imagen se observa la ausencia de brazo infrapiramidal o medial del GD del HC d.

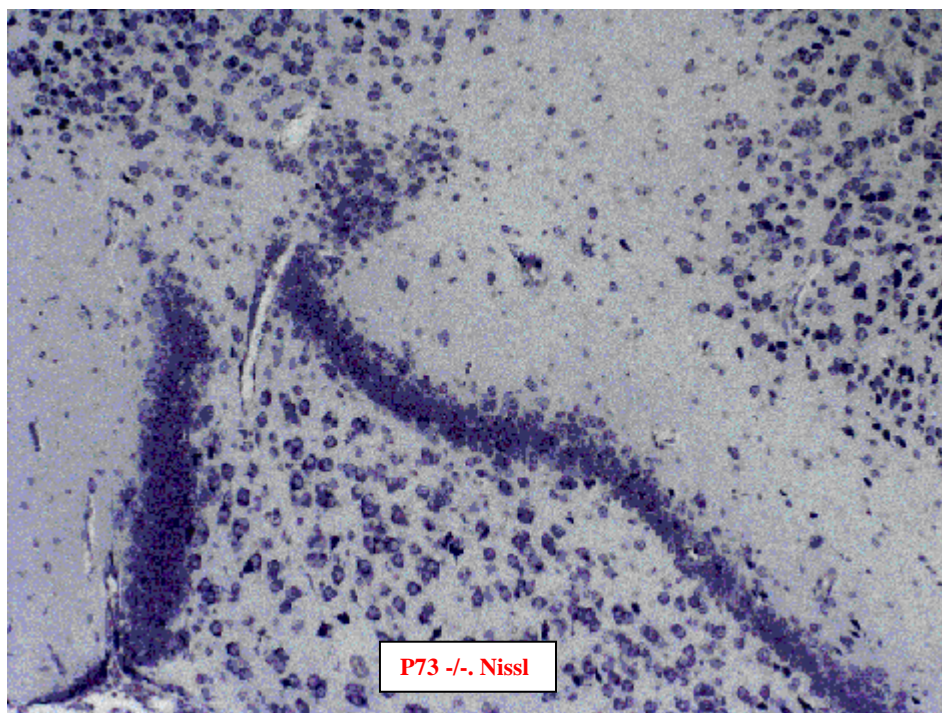


Figura 73: subiculum perforando el giro dentado (detalle)

II. 2. B. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LAS DIFERENTES POBLACIONES CELULARES DEL RATÓN MUTANTE *p73* ^{-/-}.

II. 2. B . 1. Calretinina

En los ratones salvajes la CR marca las células musgosas del hilio del HC que emiten un denso plexo CR + a la zona supragranular de la capa molecular del GD (figura 74). Esto no se ha identificado en el humano. Igualmente se pueden observar multitud de interneuronas CR + tanto en el asta de Amón como en el GD (figura 74, izquierda).

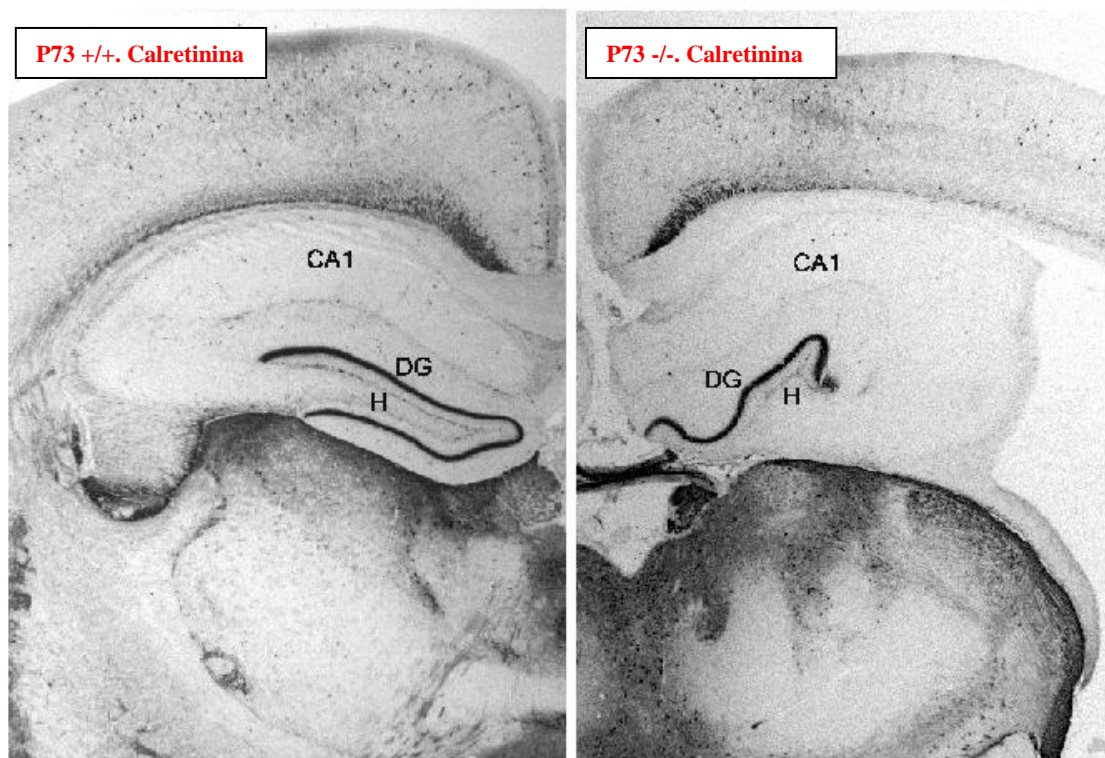


Figura 74: hipocampo dorsal, calretinina, DG: giro dentado; H: hilio del GD.

El asta de Amón.

La distribución de las interneuronas no parece alterada por sí misma en ninguno de los campos del asta de Amón, al igual que no parece alterada la cantidad de interneuronas. El cúmulo de neuronas y fibras CR + que es observable en condiciones normales en el *stratum lacunosum moleculare* del asta de Amón se mantiene, a pesar de que esta capa se encuentra malformada y fusionada con la capa molecular del GD.

Giro dentado

En el GD se mantiene la positividad intensa para CR de los granos del GD y el plexo de las células musgosas, no obstante su aspecto microscópico refleja la malformación global de la capa granular (figura 74, derecha).

Otras regiones.

Aunque no pertenece al HC, la amígdala es un centro implicado en el sistema límbico que guarda relaciones funcionales con el HC. La tinción con CR en los animales “wt” revela un plexo denso en torno al núcleo cortical posterior de la amígdala (figura 75). Estas fibras proceden del bulbo olfatorio accesorio (vía vomeronasal). La extensión de este plexo está dramáticamente reducida en el mutante (figura 76, derecha). En varios de los animales mutantes no es posible ni siquiera la identificación del núcleo cortical posterior de la amígdala.

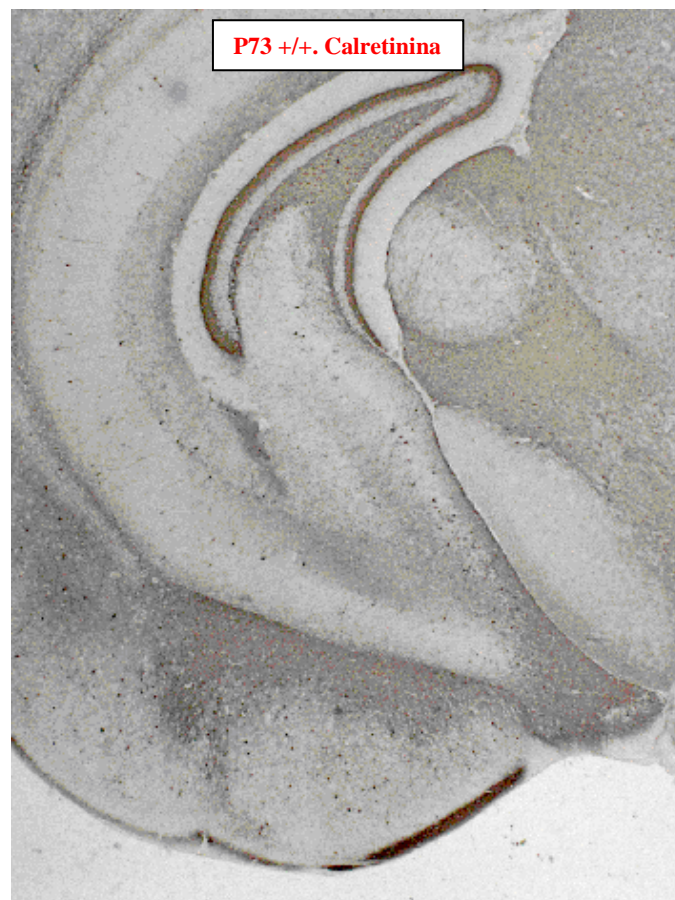


Figura 75: detalle del núcleo cortical de la amígdala en el wt (abajo, a la izquierda)

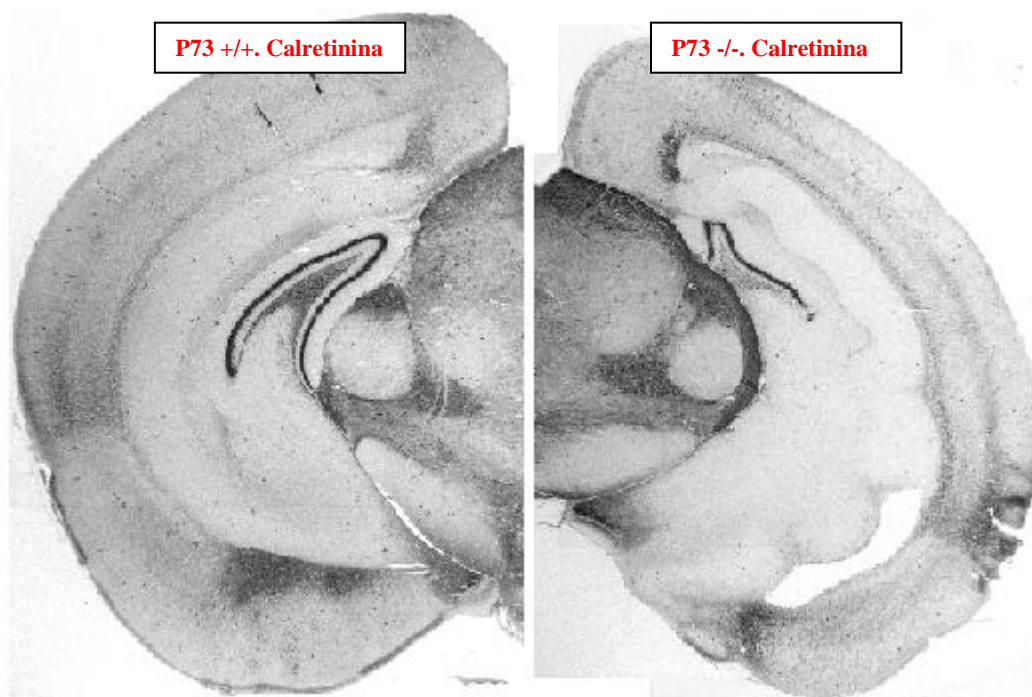


Figura 76: Hipocampo dorsal y ventral con calretinina. En el extremo ventral se observa la amígdala del wt (izquierda) y del ko (derecha), con la notable reducción del núcleo cortical de la amígdala.

II. 2. B . 2. Calbindina

En condiciones normales la CB marca las neuronas piramidales de CA1 y diversas interneuronas en el asta de Amón. El GD es intensísimamente positivo para CB, especialmente su capa molecular que es intensamente inmunorreactiva merced a la gran densidad del plexo dendrítico que en esta capa emiten las neuronas granulares. La característica más importante para este estudio de la inmunorreactividad para CB es la tinción diferencial que se produce en CA3, donde tanto las diversas clases de interneuronas como las neuronas piramidales son negativas, pero el plexo de las fibras musgosas en torno a ellas es intensamente CB + (figura 77). Se sabe que el límite de CA3 se define por el alcance máximo de estas fibras (Lorente de Nó, 1934), así que la tinción con calbindina nos permite delimitar CA3 con gran fiabilidad.

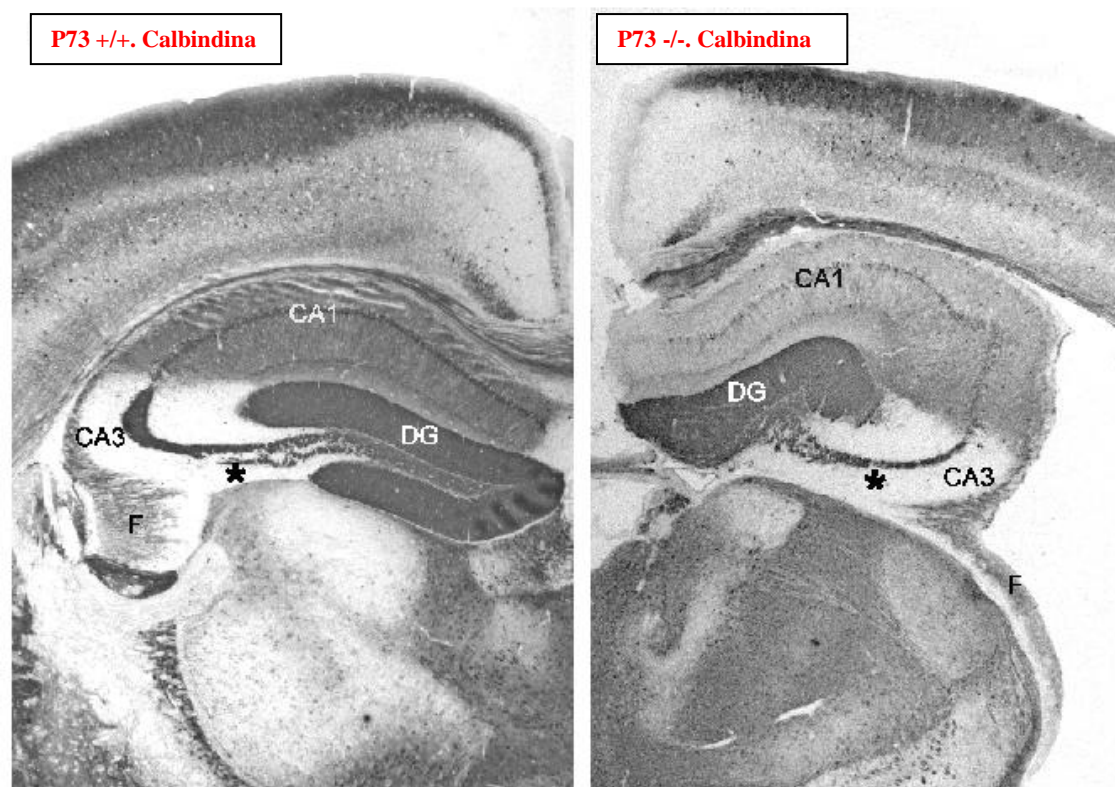


Figura 77: Hipocampo dorsal con calbindina. DG: giro dentado; F: fimbria; *: plexo de las fibras musgosas.

Asta de Amón.

CA1: La inmunorreacción positiva para la capa piramidal en CA1 está conservada, siempre teniendo en cuenta su malformación global. En varios puntos esta capa piramidal parece disminuida en intensidad, lo que le otorga un aspecto de poca compactación, y si bien es un hallazgo constante en todos los ratones mutantes, no afecta a todas las regiones del campo CA1. En general es más frecuente que esta alteración se identifique en niveles posteriores y ventrales. La característica más llamativa de la tinción con CB en CA1 se encuentra en las lobulaciones del asta de Amón: estas lobulaciones profundizan, es decir, en varios puntos se acercan al GD. En las lobulaciones que más profundizan su extremo medial (más cercano al GD) pierde las características tintoriales propias de CA1 y, sin llegar a adquirir morfología de CA3, se ve rodeado de pequeñas terminaciones nerviosas CB + (ver figura 78).

CA3: un área muy afectada se ve por la malformación del giro dentado en su morfología, no obstante el trayecto de las fibras musgosas está conservado y la

delimitación entre CA3 y CA1-2, con la salvedad antes expresada. En los ejemplares en los que CA3 en la zona medial adopta una disposición aberrante anular la parte medial de los “anillos” (figura 79), la más próxima al GD, adquiere características tintoriales propias de CA3 (Figura 78). Esta malformación se puede apreciar claramente en reconstrucciones tridimensionales generadas por ordenador (ver más adelante).

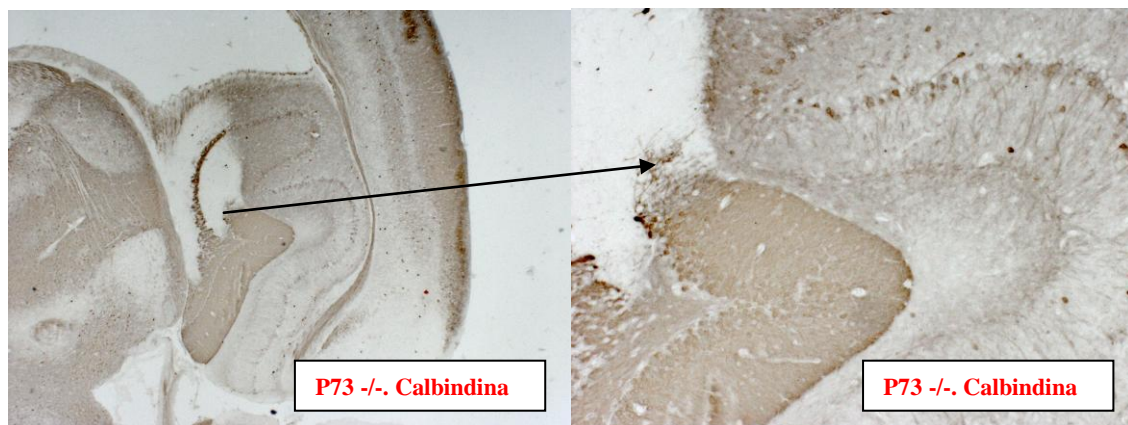


Figura 78: detalle del hipocampo dorsal y las fibras musgosas aberrantes (flecha)



Figura 79: Conexión aberrante entre hipocampo dorsal y ventral

Giro dentado.

El GD es, al igual que en el p73+/, CB positivo en su totalidad. En el GD del mutante se aprecian engrosamientos focales, aunque en mucha menor medida que el asta de Amón y engrosado en su región ventral. Estos engrosamientos no están presentes habitualmente en el HC d. Consideramos importante resaltar que, por llamativa que pueda ser la malformación del GD, el hilio está presente siempre, aunque desplazado hacia una posición subpial que normalmente nunca ocupa debido a la ausencia de la hoja infrapiramidal (figura 80).

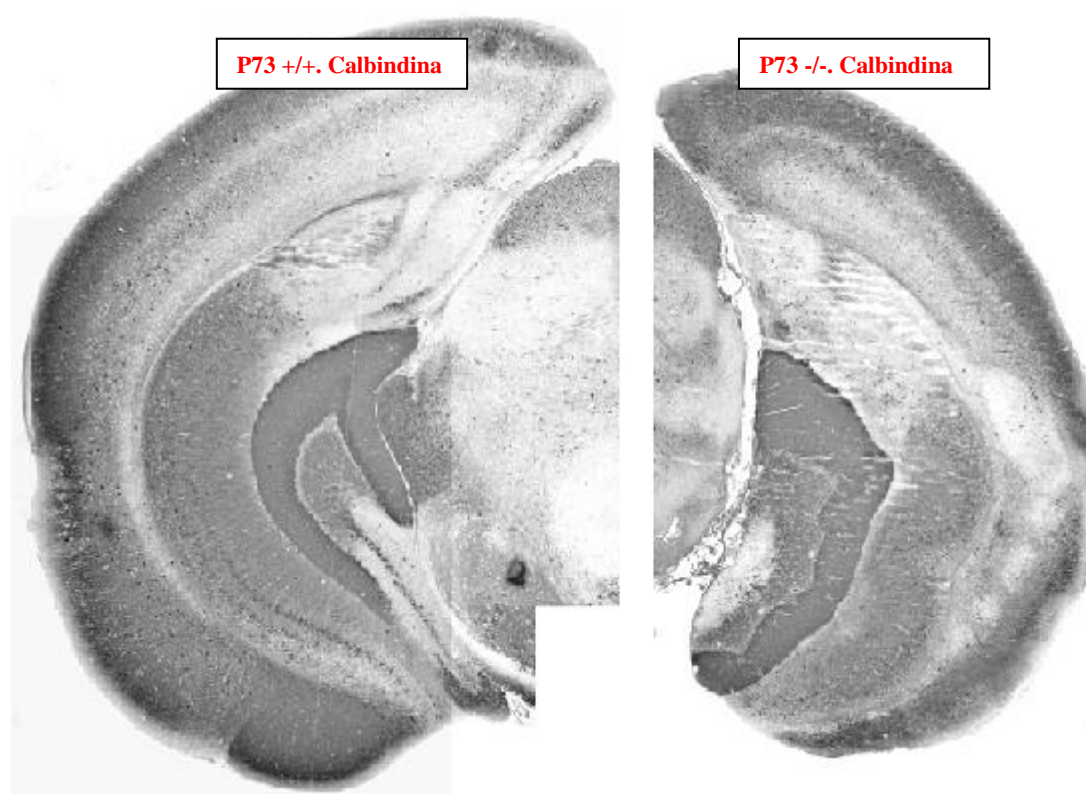


Figura 80: Hipocampo ventral del mutante (derecha) y el wt (izquierda).

II. 2. B . 3 Parvalbúmina

La parvalbúmina sirve como marcador de interneuronas, especialmente dos tipos reconocibles: las células en cesta y las células en candelabro que se encuentran en gran cantidad en el asta de Amón y en la capa granular del GD. En conjunto estas células forman plexos axonales que se disponen en torno a la capa granular y la capa piramidal.

En el ratón mutante p73 $-/-$ la disposición de parvalbúmina respeta (neuronas y fibras) la disposición esperable, teniendo en cuenta la malformación de base (figura 81).

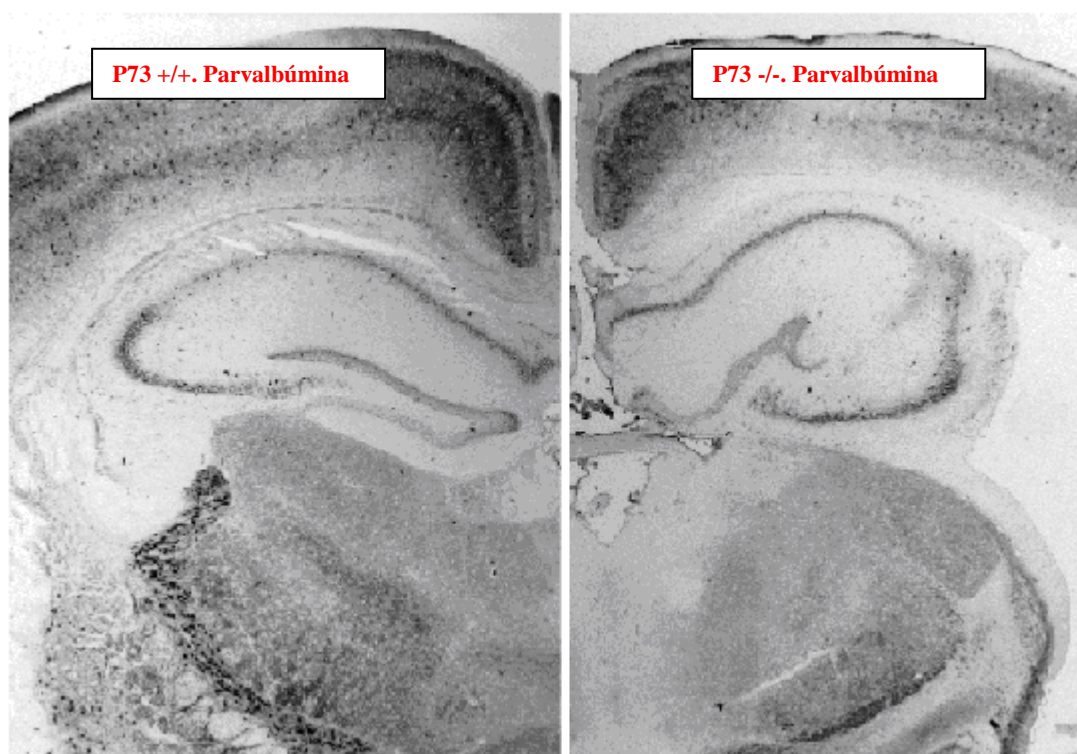
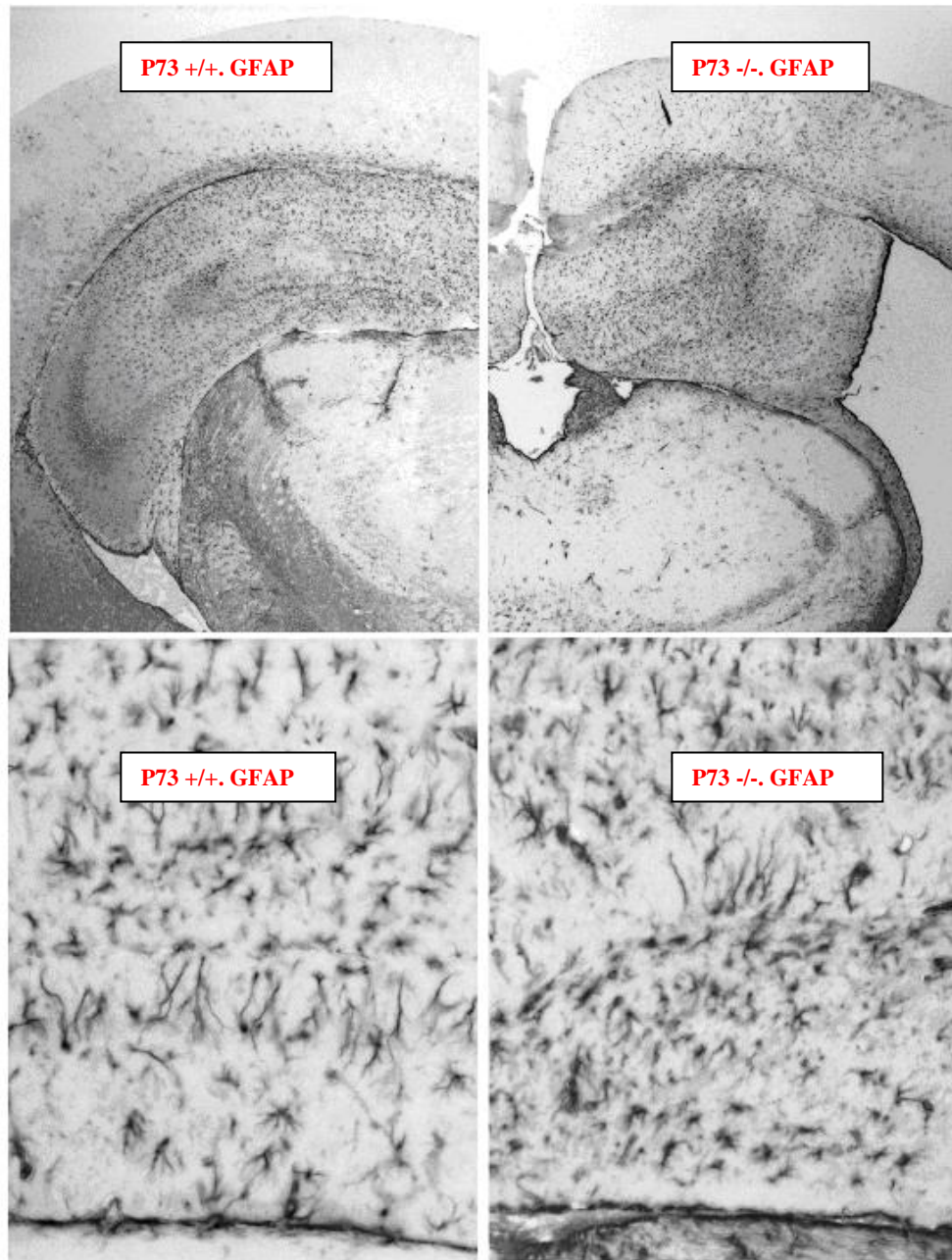


Figura 81: Parvalbúmina en wt (izq) y ko (dcha) en hipocampo dorsal.

II. 2. B . 4 GFAP.

La proteína ácida gliofibrilar (GFAP) se expresa en la glía radial y en la astroglía (Frotscher, Álvarez Buyla). En el HC señala lo que se ha llamado el esqueleto “*scaffold*” glial o esqueleto glial radial secundario. La positividad para GFAP (vimentina + en el humano) perfila todo el GD en formación desde las zonas más profundas del brazo medial infrapiramidal del GD hasta las zonas adyacentes al brazo lateral que se termina de formar en el periodo postnatal (figura 82). En el individuo adulto existen multitud de células gliales distribuidas a lo largo del HC, que se concentran en torno a las capas de células principales. Entre ellas destaca una población de células “radiales” que tienen su cuerpo en el hilio del HC y sus procesos se dirigen hacia la capa granular. En los ratones p73 $-/-$ esta población está muy disminuida, y en ella las prolongaciones células están dispuestas de manera aparentemente aleatoria, sin formar penachos (figura 83). No obstante, cabe señalar que esta afectación es

parcheada, ya que en algunos puntos se pueden distinguir grupos de células que forman penachos ordenados radialmente. Otra característica de la tinción con GFAP del HC mutante es la intensa acumulación de inmunorreacción en el fondo de las citadas lobulaciones del GD, reflejo de una intensa celularidad polimorfa y desordenada.(fig 82)



GFAP CR- control

Figura 82: Tinción con GFAP y detalle (abajo) en nuestro mutante Cristiano Ronaldo (6 meses) (dcha) y su hermano (izquierda)

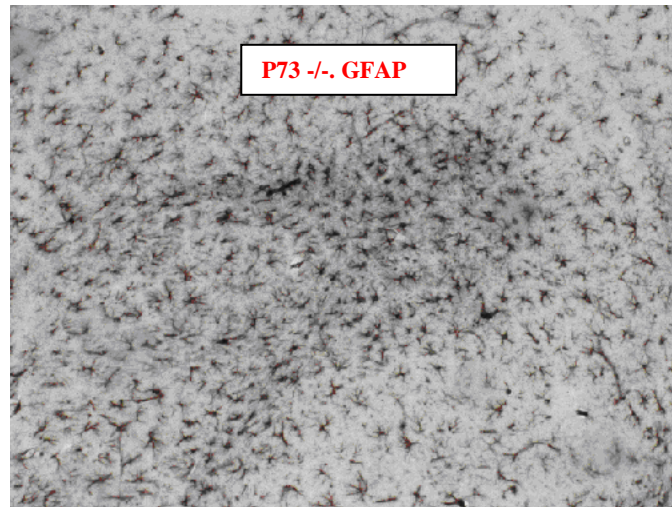


Figura 83: detalle de GFAP en un lóbulo (patológico) del hipocampo

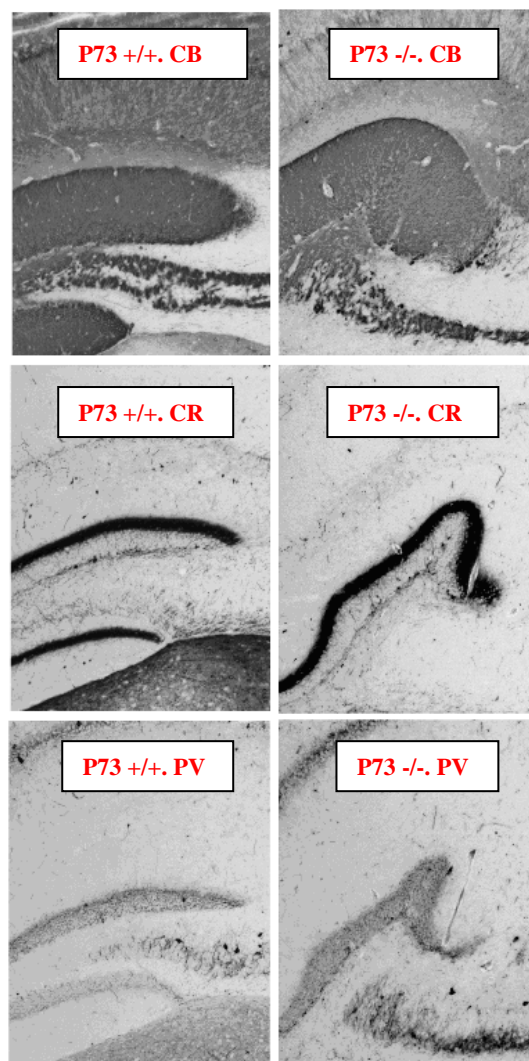


Figura 84: Resumen de las tinciones con calbindina (arriba), calretinina (medio) y parvalbúmina (abajo) en el wt (izq) y el mutante (derecha)

II. 2. B . 5 Reelin.

En el HC “wt” se pueden distinguir dos poblaciones de células Reelin +.

a) Interneuronas dispersas y abundantes en el *stratum oriens* y en el *stratum lacunosum-moleculare*, que no expresan p73. Las células Reelin+ del *stratum oriens* son más grandes y menos frecuentes que las del *stratum lacunosum molecular*.

b) Una capa fisural que forma una banda continua de células de C-R Reelin +. Esta banda penetra, desde la superficie pial, con la fisura del HC en el interior del parénquima, de tal manera que en individuos postnatales y adultos se puede delimitar la fisura del HC gracias a esta capa de Reelin. La mayoría, si no la totalidad, de estas células Reelin + expresan también p73 en los embriones.

En el ratón mutante la población de las células de Cajal Retzius desaparece. En cambio las poblaciones de posibles interneuronas del *stratum oriens* y del *stratum lacunosum-moleculare* persisten, manteniéndose por tanto cierta inmunorreacción para Reelin.

La diferenciación de las poblaciones neuronales Reelin+ se puede apreciar desde el período embrionario, donde existe coexpresión de Reelin y Tbr1 en una población de células CR+ y una expresión profunda de Reelin más dispersa en la zona del hem medial que dará lugar al HC, correspondiente con interneuronas. En el ratón mutante prenatal (que hemos analizado puntualmente para comprobar este hecho) existe la población profunda, pero la población superficial, aún existiendo, expresa una cantidad mucho menor y no sale del hem, siendo incapaz de formar la fisura del HC. En E16 interneuronas Reelin + se hacen evidentes en el futuro *stratum lacunosum-moleculare*, y justo debajo de la fisura del HC, además de en estratos más profundos del hipocampo, que se corresponde con los futuros *stratum radiatum* y *stratum oriens*. Entre E18 y el momento del nacimiento va aumentando la positividad para Reelin en la zona molecular del GD, donde coincide con la maduración del mismo (ver figuras 85 y 86)

Conforme va madurando el brazo infrapiramidal del GD postnatalmente se va observando positividad también para Reelin en la superficie que coincide con dicho brazo (figura 87). A partir del nacimiento comienza a desarrollarse inmunorreacción

contra Reelin en el hilio del HC. Esto refuerza los resultados de estudios previos realizados en el laboratorio de Anatomía de la Universidad de La Laguna en hipocampo humano (Abraham et al, 2003; Abraham et al, 2004)

Con la tinción inmunohistoquímica de Reelin (figura 85) en ratones prenatales se puede observar como la falta de fisura del HC antes mencionada se remonta hasta el estadio E15 (figuras 86 y 85), en el cuál se puede apreciar la incipiente fisura del HC como una pequeña hendidura en la superficie pial en torno a la cuál están agrupadas las neuronas de Cajal Retzius, junto con un ensanchamiento en la zona marginal. Esta hendidura es dorsal a un primordio del GD, que se corresponde con la primera matriz del dentado, y que expresa también CR y PCNA. Esta hendidura no se produce en ausencia de células de Cajal Retzius, y por lo tanto, no se produce en el mutante para p73, en el que además existe cierta expresión ectópica de Reelin, algo que también puede apreciarse en las imágenes de inmunofluorescencia.(figura 86)

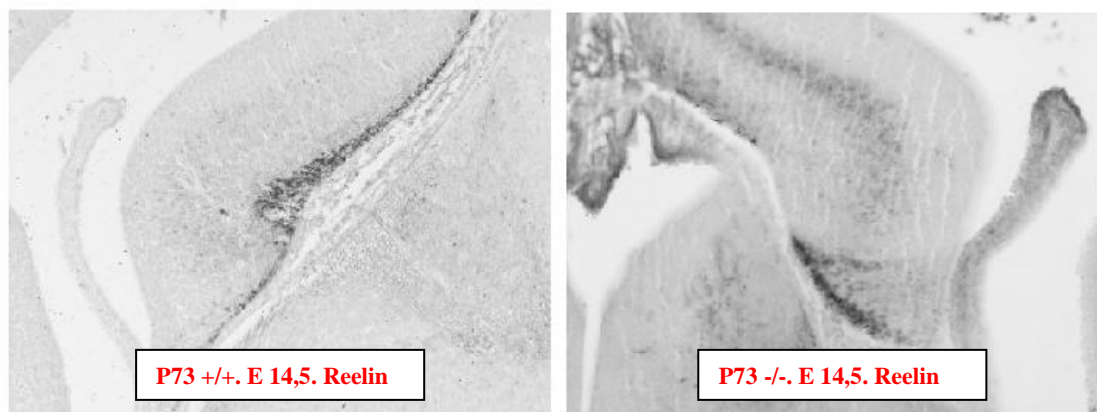


Figura 85: Hem del hipocampo en E14,5 teñido con anticuerpos contra Reelin. Wt: derecha; ko: izquierda: obsérvese la disposición anómala del Reelin.

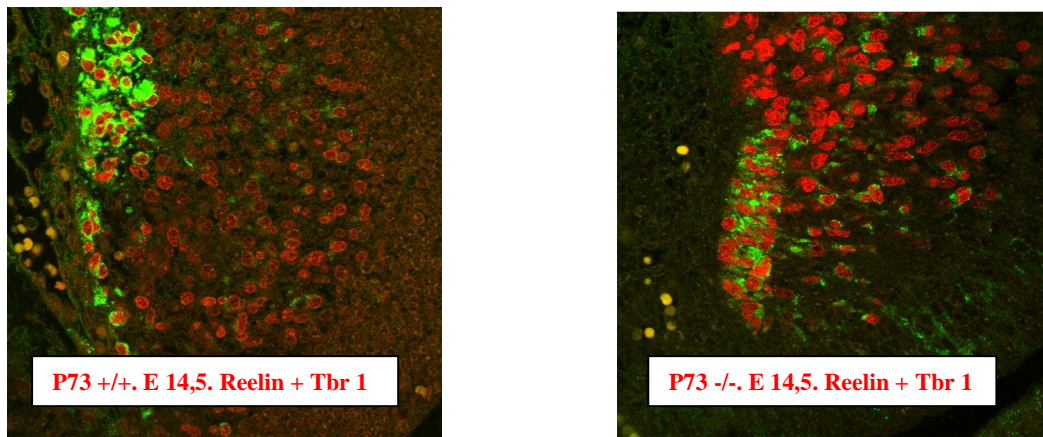


Figura 86: Inmunofluorescencia y microscopía confocal del wt (izq) y el ko (dcha) en el que se advierte la falta de progresión de Reelin en la zona marginal. En verde la expresión de Reelin, rojo para Tbr1.

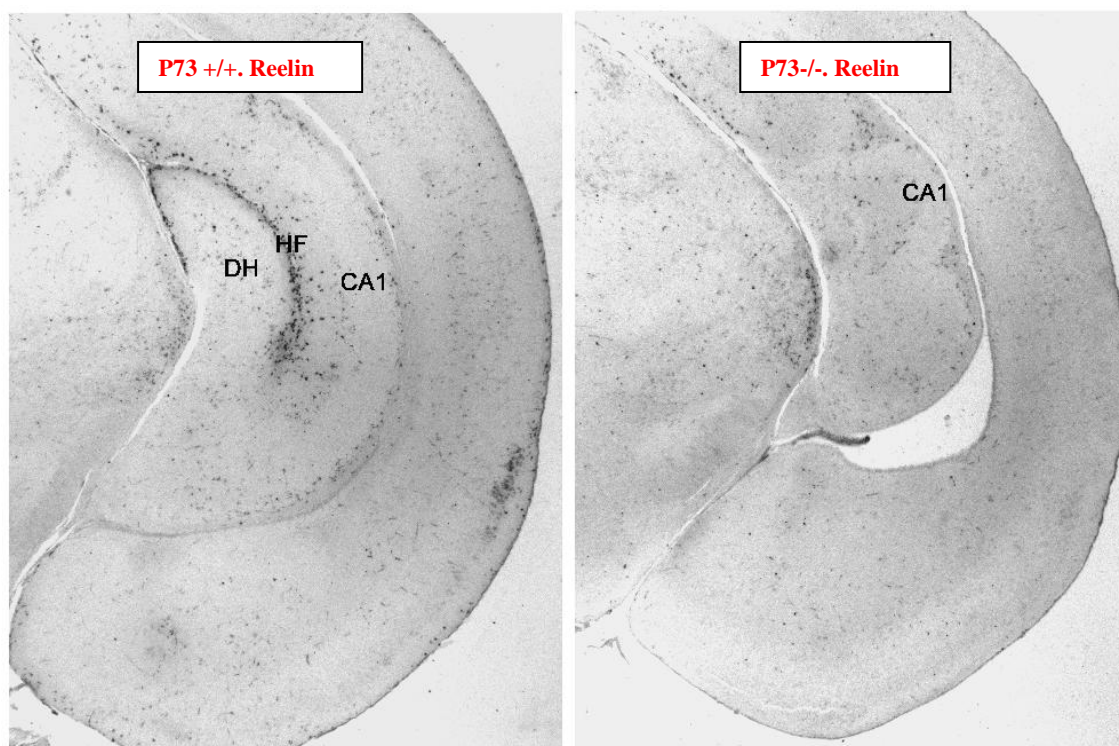


Figura 87: Ausencia de fisura (HF) en el hipocampo ko (dcha). En el wt (izq) se advierte la expresión de Reelin postnatal perifisural.

II. 2. B . 6 Neurogénesis adulta.

Utilizamos tinción inmunohistoquímica con PCNA para demostrar la presencia de proliferación celular en el giro dentado del ratón mutante adulto. La tinción resultó positiva, aunque la cantidad de células en proliferación es inferior en el mutante que en el control (figura 88).

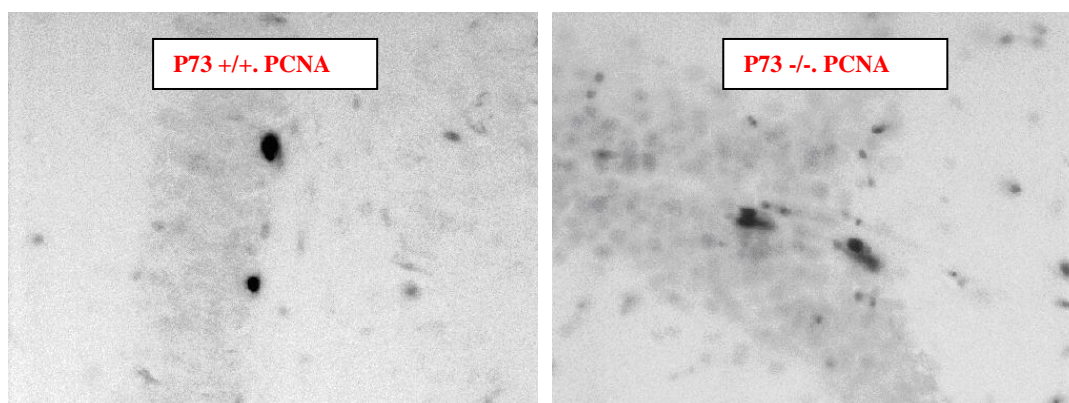


Figura 88: PCNA en el hilio del dentado del wt (izq) y del ko (dcha)

II. 1. c . RECONSTRUCCIONES TRIDIMENSIONALES.

II. 1. c. 1 Hipocampo p73 +/+.

Asta de Amón:

En un vista completa de una reconstrucción a partir de cortes sagitales del HC derecho del ratón desde el punto de vista más medial se observa como el asta de Amón y el GD aparecen como dos semiesferas con orientaciones opuestas. El asta de Amón es una lámina convexa en sentido medio lateral que deja un cavidad o escotadura mirando hacia la línea media.

Los bordes de CA1 en este esquema deben considerarse continuados por las áreas adyacentes; *subiculum* y corteza cingular dorsalmente y *subiculum* y núcleo cortical de la amígdala ventralmente, de esta forma CA1 se constituye como con una continuación “medial” simplificada de la corteza y/o de la superficie palial.

Si continuamos disecando el hipocampo en sentido lateral nos encontramos con la clásica imagen del asta de Amón entrelazado al giro dentado por CA3. CA3 emerge desde CA1-CA2 en dirección posterior en un punto intermedio entre el extremo septal y el extremo temporal, y desde ahí esta proyección (CA3) se extiende tanto en sentido medial y lateral como en sentido dorsal y ventral, dando lugar a una estructura cruciforme o en forma de aspa. CA3 forma dos extensiones que se dirigen una en dirección dorsal y otra en dirección ventral. Estas extensiones se incurvan medialmente. Así, el asta de Amón no es una estructura tubular o “semitubular” en sentido septo-temporal, sino que tiene un nudo central en un nivel intermedio entre ambos cabos; de este nudo parte CA3, que termina en un extremo ciego en el hilio del GD. Además, siguiendo este esquema se puede definir CA2, que se continúa en todo momento con CA3 como el punto de arranque de CA3, o la raíz de ese proceso cruciforme que previamente hemos mencionado. Esto aporta una definición para CA2 que no depende de la inmunohistoquímica o la histología (dado que en general no muestra características distintivas propias): CA2 sería el punto donde cambia la curvatura del asta de Amón. Además, este nudo (o la estructura cruciforme en su conjunto) diferencia una región dorsal del HC de otra ventral y de esta forma la reciente diferenciación funcional/ genética de HC d e HC v (Fanselow y Dong, 2010) se refleja en un sustrato morfológico (Figura 89).

Giro dentado.

El GD está conformado por dos hojas plegadas en ángulo agudo. Una de ellas, llamada suprapiramidal, es lateral a CA1 y medial a CA3. En conjunto, estas dos hojas están incurvadas en forma de semiesfera en dirección opuesta a la semiesfera que forma el asta de Amón. Las dos hojas se fusionan en forma de anillo rodeando a CA3 en su extremo temporal, esta estructura anular está delimitada por fisura del HC, que en conjunto se interpone en todo momento entre CA1/CA2 y dentado pero nunca entre CA3 y dentado. Dado de CA1 se continúa con el resto de la corteza a través del *subiculum* y el giro dentado se ve aislado de CA1 por la fisura del hipocampo, llega a un extremo ciego posterior del dentado que engloba a CA3. La única conexión física del giro dentado con el asta de Amón es con CA3 y esta continuidad física es a través de la

capa polimorfa del GD que en la actualidad se identifica con el hilio del GD. Comparando nuestro modelo tridimensional con imágenes histológicas se aprecia como el GD siempre se encuentra bajo la piamadre. En el brazo infrapiramidal está bajo la pía que separa telencéfalo de diencéfalo y en el brazo suprapiramidal está bajo la piamadre de la fisura del HC, obliterada en el adulto aunque no deja de existir piamadre en torno a las arterias hipocampales que caminan por la fisura rodeadas de sus correspondientes espacios de Virchow-Robin. En el punto de unión entre HC d e HC v no se forma fisura del HC (ver figura 89 y 90, izquierda y figura 91 de A, B, C).

II. 1. c. 1 Hipocampo p73 -/-.

En la reconstrucción del mutante se aprecian las lobulaciones del asta de Amón y la malformación del dentado, que aparece como una lámina continua que permanece cercano a la superficie pial y desarrolla procesos en direcciones patológicas, que interpretamos como pequeños focos ectópicos de granos. Además, la “cruz” del HC parece desplazada lateralmente y no adopta una posición normal, tal y como se ha mostrado en las imágenes de inmunohistoquímica (ver figuras 89 y 90, derecha y figura 91, D, E, F)

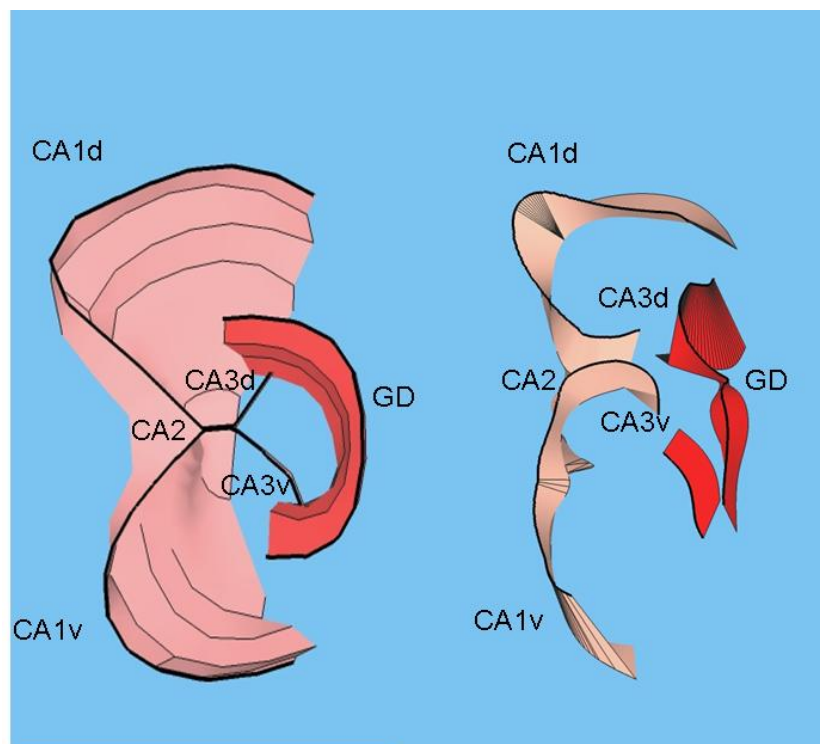


Figura 89: transición entre hipocampo dorsal y ventral en el ko p73 -/- (derecha) y el wt (izquierda)

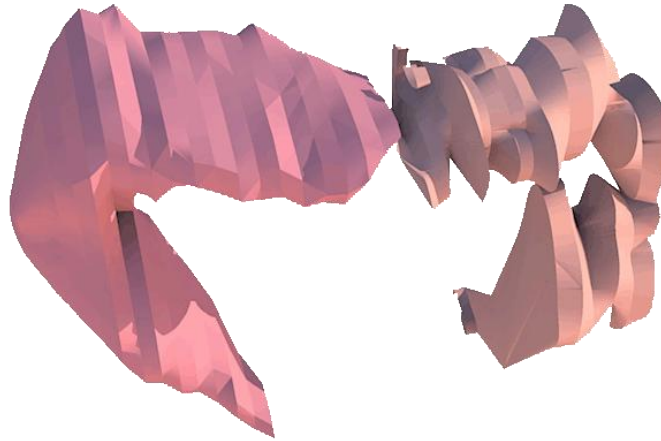


Figura 90: perfil del asta de Amón en el ratón p73 $-/-$ (derecha) y el wt (izquierda)

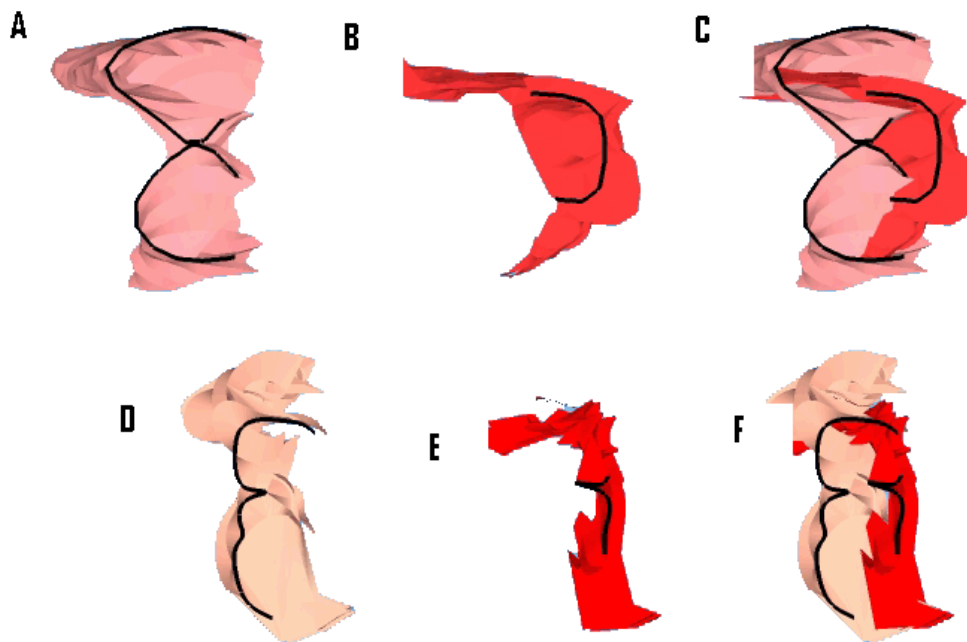


Figura 91: La reconstrucción tridimensional del hipocampo muestra al asta de Amón como una figura en forma de dos semiesferas abiertas hacia posterior (CA1d y CA1v) que contactan (CA2) y que emiten dos proyecciones mediales (CA3d y CA3v) destinadas a introducirse en el GD (A), de esta forma se distingue un hipocampo dorsal y otro ventral ambos unidos por CA2. El GD se desarrolla en la región subpial (B) como una semiesfera abierta hacia anterior que sigue a la superficie pial que recubre a la fisura del hipocampo (flecha) formando así la estructura en dos hojas característica. (C). En ausencia de fisura el GD se mantiene como una estructura monolaminar, que corresponde a la hoja suprapiramidal (E). La fusión entre hipocampo dorsal y ventral no se forma normalmente tampoco en el ratón p73 $-/-$ (D, F), donde no hay continuidad entre CA3v y CA3d. D,E,F son imágenes construidas a partir del ko. El asta de Amón (salmón) es anterior al giro dentado

II. 2. Breve introducción al análisis conductual del ratón adulto p73 -/-

Tal y como se ha mencionado, el aprendizaje condicionado y su análisis mediante tests como el *Shuttle Box* se consideran marcadores de integridad funcional de CA1. Para valorar esto en ratones p73 -/- se utilizaron seis casos y nueve controles, todos ellos de sexo masculino y seis meses de edad y se registró el porcentaje de respuestas condicionadas a lo largo de cuatro días de pruebas (Tabla 8). Con estos datos se dibujaron dos curvas de aprendizaje (Figura 92).

Ratón	Día1	Día2	Día3	Día4
Control1	10	10	10	15
Control2	24,3	31,57	8,57	10
Control3	10,34	10,25	29,7	29,7
Control4	0	5	25	10
Control5	0	0	0	0
Control6	0	17,5	10	39,4
Control7	7,69	5	4,14	92,5
Control8	3,35	92,5	85	92,5
Control9	0	0	2,5	12,5
Promedio Controles	6,18666667	19,09111111	19,43444444	33,51111111
Caso1	0	0	0	2,5
Caso2	0	0	5	12,5
Caso3	0	0	0	0
Caso4	17,5	2,5	2,5	5
Caso5	0	0	0	4,8
Caso6	0	0	0	4,8
Promedio KO	2,91666667	0,41666667	1,25	4,93333333
Promedio general	4,87866667	11,62133333	12,16066667	22,08

Tabla 8: Aprendizaje condicionado.

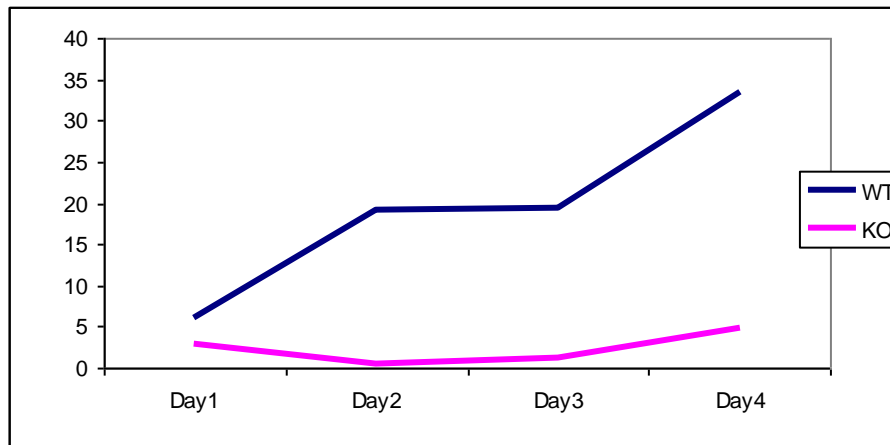


Figura 92: Curvas de aprendizaje.

Estos datos muestran una clara repercusión funcional sobre el aprendizaje, aunque no un impedimento completo, dado que la tendencia es claramente ascendente. Esta es la relación topográfica y funcional más simple que se puede establecer. Sería necesario dilucidar hasta qué punto este claro retraso en la adquisición del conocimiento interviene en la gran mortalidad infanto juvenil de estos animales, y el posible componente adaptativo de este fenómeno, más allá de las malformaciones descritas. Además, conforme se cuente con una población de ratones p 73 -/- que permite elaborar distintos tipos de pruebas conductuales, se podrán obtener más datos sobre la función de un HC carente de fisura.

DISCUSIÓN

Destacamos como contribución más destacada de este trabajo la descripción del desarrollo del HC humano a partir de un HC dorsal, derivado de un cortical hem dorsal y de carácter transitorio, en continuidad con un hipocampo ventral, derivado de un hem ventral, que persiste y se diferencia enormemente en nuestra especie. Para ello, este trabajo se centra en las migraciones del giro dentado, estableciendo las diferencias entre el GD del HC d y del HC vl. Además, mediante un modelo animal, el del ratón mutante carente del factor de transcripción p73, señalamos la importancia de la fisura del HC como eje geométrico de la formación del HC, y el posible papel de las células de Cajal Retzius en su formación.

I. Aspectos generales del desarrollo del hipocampo humano

Mientras que el desarrollo postnatal del HC humano se ha estudiado de forma detallada (Insausti et al., 2010; Insausti et al., 2012), existen pocos estudios prenatales comparables al nuestro, en parte debido a las limitaciones técnicas, metodológicas y éticas a la hora de investigar en material fetal humano. Estas dificultades han impedido hasta ahora la elaboración de un calendario detallado del desarrollo del HC humano desde edades fetales tempranas hasta el recién nacido. La mayor parte de las investigaciones durante el periodo prenatal se han centrado en aspectos parciales del desarrollo hipocampal, tales como la formación de la fisura del HC, la positividad a la CB y CR de los granos del dentado maduros e inmaduros, respectivamente, mielinización pre-y postnatal, neurogénesis del asta de Amón y *subiculum* (Humphrey, 1967; Arnold y Trojanowsky, 1996; Kier et al. 1997; Abraham et al, 2004; Yang et al, 2014; Cipriani et al, 2015). Uno de nuestros principales objetivos ha sido la elaboración de una línea temporal del desarrollo del hipocampo y la subdivisión del mismo en períodos, lo cual subsana de forma parcial un déficit existente en la literatura. Nos hemos limitado al estudio del asta de Amón (*hippocampus proper*) y el GD, dejando de lado el *subiculum* y estructuras adyacentes del lóbulo temporal medial, porque en estas edades tempranas son difíciles de identificar. Nuestro estudio es morfológico y neuroquímico, y no entramos en los mecanismos moleculares y genéticos subyacentes.

De de los pocos trabajos recientes comparables al nuestro, por objetivos y por la similitud en el tipo y la cantidad de material estudiado, destacamos el realizado por Yang y colaboradores (2014). No obstante, este trabajo carece en cierta medida de correlación anatómica y describe como pertenecientes a la placa hipocampal estructuras y poblaciones celulares Nestina +, NeuN+ a las nueve semanas del desarrollo embrionario, cuando el cortical hem se encuentra presente y la placa hipocampal aun no se ha formado (Abraham et al., 2004). Un estudio más comparable al nuestro fue realizado previamente en nuestro laboratorio de Anatomía de la Universidad de La Laguna con el

mismo material de referencia (Abraham et al., 2004), y de alguna manera esta tesis representa la continuación de aquel trabajo. Abraham et al. (2004) identifican el cortical hem entre las 7 y las 11 SG, cuando aún no se encuentra presente la placa Amónica. El hem es el borde medial o limbo de la corteza que limita con el plexo coroideo, y fue descrito como un centro de señalización molecular necesario para el desarrollo del HC y de la corteza mediante la síntesis de proteínas de la familia de BMP y Wnt (Grove et al., 1998; Grove y Tole, 1999; Abu Khalil et al., 2004).

El hem no es un único punto, sino que se puede definir como un conjunto de estructuras que se encuentran en el límite entre la corteza y los plexos coroideos, que expresa Wnt y BMP, y produce células de Cajal Retzius (Subramanian et al., 2009; Meyer, 2010; Roy et al, 2013), y que estaría compuesto por el *septum*, el hem dorsal, el hem ventral y la eminencia talámica. Además el hem humano es una estructura de gran tamaño, a diferencia de los equivalentes en otras especies (Meyer et al., 2002).

Abraham et al. (2004) se centran en las células de Cajal Retzius que se forman en el hem dorsal y ventral y migran a las fisuras del HC dorsal y ventral, respectivamente, añadiendo de esta forma una funcionalidad de fuente celular al cortical hem como origen de las células de Cajal Retzius (Meyer et al., 2002; Bielle et al., 2005; Yoshida et al., 2006).

Otro estudio muy reciente sobre la embriología del hipocampo humano es el de Cipriani et al. (2015) que utiliza una serie de casos parecida a la nuestra, utilizando marcadores de neurogénesis y diferenciación piramidal, centrándose en el asta de Amón del HC v. Al igual que nosotros y Abraham et al. (2004), Cipriani et al. (2015) definen la zona primordial del HC como aquella inmediatamente adyacente al cortical hem. A las 9-10 SG identifican una población de progenitores neuronales que coexpresan Pax6, Ctip2 y Ki67 en el neuroepitelio del primordio HC ventral, con una semana de antelación frente a lo que encontramos en nuestro material. Esta diferencia en el tiempo se puede explicar en parte por la dificultad de delimitar la edad gestacional o postconcepcional, ya que en los estadios tempranos una diferencia de 2 o 3 días puede llevar a la aparición de estructuras no existentes previamente. También hay que tener en cuenta que las células progenitoras Pax6+ y Tbr2+ en la zonas ventricular / subventricular se marcan antes de la aparición franca del HC, lo cual permitiría una identificación más temprana de las neuronas hipocampales. No obstante, las células de Cajal Retzius que dominan en esta fase el cortical hem, expresan los mismos marcadores que las demás células excitatorias paliales, incluidas las del HC (Hevner et al., 2003), Pensamos pues que es difícil diferenciar en los primeros estadios entre futuras células del HC y células de Cajal Retzius inmaduras, a no ser que se use p73 como marcador específico de estas últimas. Según Abraham et al. (2004) la aparición franca del primordio hipocampal y la desaparición del cortical

hem tiene lugar en torno a las 11-12 SG, con lo cual nos movemos en un margen temporal muy estrecho. Puede haber una superposición en el tiempo en la producción de las células de C-R p73+ y de las primeras neuronas hipocampales,

Varios estudios (Abraham et al., 2004; Yang et al., 2014;) coinciden en la expresión de CR en diferentes poblaciones neuronales y en distintos momentos del desarrollo, que se produce tanto en el primordio del dentado, en granos recién formados, como en diversas interneuronas en el resto de componentes del HC. Otra coincidencia general entre los estudios es la utilidad de la CB y CR como marcadores de parcelación citoarquitectónica en el HC, especialmente durante el primer trimestre. En el estudio de Abraham et al. (2004) se observa esta misma parcelación y se comprueba la naturaleza no granular de las primeras células CR + del primordio del dentado debido a la ausencia de actividad proliferativa con doble inmunohistoquímica CR / ki-67. Esta población de células CR + del primordio del giro dentado parece ser común al humano y al mono (Eckenhoff y Rakic, 1984; Abraham et al., 2004) pero no ha sido encontrada en ratones. Nosotros interpretamos esta población inicial como células primordiales o pioneras del GD, que podrían emitir las primeras proyecciones hacia la fimbria, como hemos observado con CR. En el GD adulto hay una población de interneuronas grandes CR+ en el hilio que no se ha descrito en otras especies (Suarez-Solá, 1996), que podrían corresponder a estas neuronas primordiales de los estadios iniciales. Futuros estudios van a tener que aclarar la naturaleza de estas primeras neuronas del GD, tal vez analizando la posible expresión de GABA, ya que según Khazipov et al. (2001), los primeros circuitos del HC fetal del primate son GABAérgicas y excitatorias a la vez (Ben-Ari et al., 2004).

Por otra parte, la CB ha sido ampliamente utilizada para definir poblaciones neuronales adultas; la CB es un marcador de determinados tipos de interneuronas, pero también marca las neuronas principales del HC, es decir, las células piramidales de los campos CA1 y CA2, y los granos del GD (Seress et al., 1992; Seress et al., 1993). Otros autores identifican una inmunorreactividad fetal temprana para CB en las capas más profundas del *stratum pyramidale* del asta de Amón (Abraham et al., 2009) indicando una diferenciación neuronal más temprana que en otras regiones corticales (Yan et al., 1997). La adquisición de inmunorreactividad para CB a medida que se produce la maduración es también una característica propia de las neuronas granulares maduras del GD (Abraham et al., 2009). La presencia de la CB en las fases más tempranas de la placa Amónica es un hallazgo destacable, ya que nos permite definir la primera aparición de la placa Amónica. En este contexto es interesante señalar que asta de Amón y *subiculum* representan las primeras porciones de corteza que se desarrollan plenamente, antes que las áreas neocorticales (Kostovic et al, 1989; Cipriani et al.,

2015), y que las primeras conexiones recíprocas con la corteza entorrinal se establecen en torno a las 19 SG (Hevner y Kinney, 1996).

La positividad a la CB en la primera condensación de células piramidales del asta de Amón, en torno a las 12 SG, distingue la placa amónica de la placa pionera neocortical, que es positiva a la CR (Meyer et al., 2000; González-Gómez y Meyer, 2014). Esta diferencia neuroquímica nos parece importante, ya que demuestra que la placa amónica no es simplemente una continuación de la placa (neo)cortical medial, sino que tiene desde sus primeros momentos aspectos propios y diferenciales. Queremos resaltar que la inmunoreactividad a la CB parece definir la placa amónica primordial en general, y que no nos va a indicar si corresponde a la primera aparición del campo CA1, en el cual se va a conservar la positividad a la CB en la vida adulta.

Un dato que puede llevar a la confusión es la intensa positividad a la CB del cortical hem humano (Cabrera Socorro et al., 2006; Meyer 2010; Roy et al., 2014). Esta positividad desaparece a las 10 SG (González-Gómez y Meyer 2014), anterior a la aparición de la placa amónica CB+ a las 11-12 SG, y por tanto no se corresponde con la de células progenitoras del HC. La CB marca también células progenitoras del plexo coroideo (datos sin publicar) y subpoblaciones de células de Cajal Retzius (Verney y Derer, 1995), por lo que puede marcar estadios funcionales transitorias de determinadas poblaciones celulares.

II. Periodos principales en el desarrollo hipocampal

Establecemos una serie de períodos en el desarrollo del HC humano que pueden servir como marco para en un futuro establecer correlaciones moleculares y funcionales.

A) *Período del hem y primera aparición del HC (7 -11 SG).* Dentro del sistema del hem (Meyer 2010; Roy et al., 2014) se distingue un hem dorsal y un hem ventral, conectados entre sí por una lámina de conexión de origen coroideo que tiene actividad proliferativa. A las 10 SG aparece el rudimento hipocampal dorsal. La aparición del primordio hipocampal ventral es ligeramente posterior, a las 11 SG. Esta cronología coincide básicamente con la descrita por Cipriani et al. (2015). Ambos HC se encuentran controlados por sistemas de señalización distintos (Roy et al., 2013).

B) *Período intermedio (11-13SG).* El rudimento hipocampal dorsal y el rudimento hipocampal ventral son estructuras simétricas conectadas entre sí mediante la lámina de conexión coroidea. Ambas se encuentran unidas en el polo posterior del telencéfalo. La placa amónica es CB+ y el

primordio del dentado se puede diferenciar gracias a la presencia de una población de células pioneras CR+. En estas mismas edades se identifican células Tbr2+ en la zona subventricular del primordio amónico y neuronas piramidales Tbr1+ en la placa amónica, junto con la presencia de células C-R Tbr1+, p73+, Reelin+ en la zona marginal (Abraham et al., 2004; Hodge et al., 2013; Cipriani et al., 2015). Hacia el final de este período comienza la migración del dentado, detectándose la segunda matriz del dentado como una densa corriente migratoria que se dirige desde la zona ventricular (primera matriz) hasta la superficie pial, donde aparecen los primeros granos Prox1+ en ambos HC d y HC v.

C) *Período de diferenciación ventral* (14-21 SG). Comienza con la profundización del componente ventral de la fisura del hipocampo a las 14 SG. En esta edad observamos un gran ensanchamiento de las regiones uncas que denominamos **eminencia hipocampal**. El HC d comienza a atrofiarse conforme el cuerpo calloso crece desde su origen embrionario anterior en la lámina comisural de Hochstetter (1919) hacia niveles posteriores. Mientras, la cabeza del HC aumenta en tamaño y complejidad. Finalmente, el HC queda limitado al componente ventral, formado por una cabeza compleja y un cuerpo y una cola más sencillos que, en niveles posteriores, permanecen unidos a un resto de HC dl, representado por la *fasciola cinerea*. El GD es una estructura continua que se extiende desde la *fasciola cinerea* hasta su extremo uncal.

D) *Crecimiento y girificación de la cabeza hipocampal*. La cabeza del HC tiene una estructura muy compleja que se intuye desde los estadios mas tempranos. Por un lado, encontramos desde las 13 SG una gran eminencia hipocampal que posiblemente representa estructuras amónicas y subiculares del uncus anterior. La fisura uncal, continuación rostral de la fisura del HC, se reconoce aproximadamente a la misma edad. En las edades estudiadas en detalle en esta tesis, la placa amónica y subicular no muestra ondulaciones ni inicios de girificación. Este proceso es mas tardío y acontece después de las 25 SG, para ser evidente a las 35 SG y sobre todo en el recién nacido a término. La compleja configuración del GD en la cabeza del HC, donde forma la cinta de Giacomini, es también un fenómeno tardío.

III. El desarrollo de la fisura del hipocampo

La fisura del HC ha sido poco estudiada en la literatura, casi siempre la relacionada con el HC del roedor y ha sido considerada durante mucho tiempo como una característica secundaria o un mero “artefacto” generado por el crecimiento diferencial del giro dentado y el asta de Amón. Uno de los pocos autores que profundizó en la época pre inmunohistoquímica en el desarrollo de la misma ha sido Tryphena Humphrey (1967) quien definió y discutió conceptos que hemos encontrado de utilidad en este trabajo. Junto con los trabajos de Humphrey nos hemos basado en estudio el Abraham et al. (2004) sobre las células de Cajal Retzius hipocampales. Nuestros datos coinciden a grandes rasgos con los encontrados por Humphrey (1967), aunque existe un desajuste de aproximadamente una semana entre la edad gestacional de los fetos usados por la autora americana y los nuestros, que puede deberse a diferentes métodos de datar el embarazo. Abraham et al. (2004) describen la futura fisura del HC como un ensanchamiento de la zona marginal visible en la superficie del primordio hipocampal entre la 9 y la 11 SG. En esta zona marginal se identifican también las prolongaciones terminales (*endfeet*) vimentina + de la glia radial en la superficie pial junto con la población de células C-R p73+ Reelin+ (Abraham et al., 2004). Antiguamente estas células fueron identificadas como células marginales indiferenciadas (Hines, 1922) y la zona marginal ensanchada corresponde con lo que se ha llamado en la literatura clásica “zona difusa” (Brown, 1922; Humphrey, 1967; Kier et al., 1997).

A partir de las 11 semanas Humphrey (1967) relaciona el tamaño de la fisura del HC con el del GD en formación (hay que tener en cuenta que se inicia lo que hoy conocemos como la migración secundaria). Al igual que nosotros, entre las 12 y 13 SG Humphrey identifica una distribución relativamente uniforme de la fisura del HC que, siendo aún relativamente superficial, comienza a profundizarse. A partir de las 15 SG acontece el gran desarrollo de la fisura en la porción temporal, fenómeno observado también por autores más antiguos (Macchi, 1951, Humphrey 1967). La profundización de la fisura ventral es opuesta a lo que acontece en el HC dorsal, y hasta se podría hablar de una falta de desarrollo de la fisura dorsal más allá de una indentación superficial. Abraham et al. (2004) se centran a partir de la 11 SG en el HC ventral y no siguen el desarrollo de la fisura dorsal. Podemos afirmar, sin embargo, que el HC dorsal transitorio sí tiene una fisura hipocampal incipiente caracterizada por un acúmulo de células C-R en una zona marginal algo ensanchada, que no llega a tener la profundidad de la fisura ventral.

La presencia de neuronas de Cajal Retzius en la zona marginal de la fisura es una constante en el desarrollo del HC y, probablemente la causa fundamental del desarrollo de la misma en virtud de los

mecanismos moleculares que comentaremos más adelante (Stumm et al., 2003; Guyon y Nahon, 2007). La “zona difusa” de Humphrey (1967), observada también en nuestros fetos a partir de la 14 SG, corresponde a la zona marginal muy ensanchada de la fisura en las que se agregan las neuronas de Cajal Retzius . Por lo tanto, la profundización de la fisura no es solo consecuencia mecánica de un crecimiento diferencial del GD y del asta de Amón, tal como propusieron algunos autores (Humphrey, 1967; Kier et al., 1997); se trata en cambio de un proceso activo en el que las neuronas de Cajal Retzius participan en su formación y profundización, tal como demuestra la ausencia de la misma en el modelo de ratón p73 -/- que carece de estas células.

En edades fetales más avanzadas, la fisura se estrecha y se hace cada vez menos evidente. Sin embargo, la presencia de C-R p73+, Reelin+, define también la parte obliterated de la fisura, estableciéndose de esta forma un límite entre *subiculum*/campo CA1 y el brazo suprapiramidal del GD. La fisura del HC es una zona muy vascularizada, con vasos rodeados de piamadre, y las células de Cajal Retzius persisten hasta edades postnatales (Abraham y Meyer 2003). En el adulto, la fisura obliterated puede en ocasiones dar lugar a confusiones con alteraciones quísticas en exploraciones radiológicas (Kier et al. 1997).

IV. El papel de las células de Cajal-Retzius en el desarrollo de la fisura del HC. El ratón p73-/-

Las neuronas de Cajal Retzius son la población celular dominante en la zona marginal tanto de la neocorteza como de la arquicorteza. Una parte importante nace en el cortical hem y migra tangencialmente hacia la zona marginal de la placa neo y arquicortical, tanto en el humano como en el ratón (Grove y Tole, 1999; Meyer et al., 2002; Abraham et al., 2004).

Abraham et al. (2004) profundizaron en el papel de las células de Cajal Retzius en el HC y establecieron una cronología de su aparición y distribución. Al igual que en el presente estudio, se utilizó la expresión de Reelin y p73 para caracterizarlas (Yang et al, 2000; Abraham y Meyer, 2003). Las células de Cajal Retzius aparecen ya en el hem embrionario. A las 10 SG comienza a identificarse una amplia zona marginal a modo de fisura del HC inicial donde se acumulan las células de Cajal Retzius . A partir de la 16 SG, Abraham et al. (2004) detectan una zona marginal propia en el GD que recibe nuevas células de Cajal Retzius desde focos proliferativos p73+ en el ventrículo perifimbrial, dado que el hem ya no existe. Esta fase de desarrollo coincide con las semanas de gestación en los que en nuestro estudio se produce un dramático desarrollo diferencial del HC v.

Para analizar la relación entre las células de Cajal Retzius y la fisura del HC nos hemos valido del ratón p73 ^{-/-}, que carece de estas células (Yang et al., 2000). La importancia de las neuronas de Cajal Retzius clásicamente se atribuye a su papel como fuente productora de Reelin (D'Arcangelo et al, 1995), una proteína secretada que es esencial para la correcta laminación cortical (Lambert de Rouvroit y Goffinet, 1998) tanto en la neocorteza como en el HC. No obstante, el fenotipo *reeler* no se reproduce en el ratón p73 ^{-/-}, probablemente porque el Reelin secretado por otras poblaciones celulares baste para rescatar el fenotipo “salvaje”.

La característica más importante del HC p73 ^{-/-} es la ausencia total de fisura del HC (Meyer et al, 2004), debida a la falta de células de Cajal Retzius a través de un efecto independiente de Reelin, dado que Reelin se sigue expresando en interneuronas del *stratum lacunosum-moleculare*. Por el contrario, el ratón *reeler* tiene fisura del HC y células C-R p73⁺ que no secretan Reelin (Frotscher et al., 2003; Meyer et al., 2004). El déficit de p73 se manifiesta desde los momentos más tempranos de la corticogénesis y se debe a una alteración cualitativa en el desarrollo y no simplemente a una disminución de la profundización de la fisura. Aunque el ratón p73^{-/-} no muestra una alteración en la laminación comparable a la que existe en el ratón *reeler* con inversión de las capas del asta de Amón y dispersión de los granos del GD (Frotscher et al., 2003), sí muestra una gran deformidad del HC que consiste en la ausencia de brazo medial del GD y ondulaciones anómalas del asta de Amón. Al faltar la hoja infrapiramidal del GD probablemente debido a una alteración en la neurogénesis, el hilio está desplazado a una posición subpial y aumentado de tamaño.

El modelo del ratón p73^{-/-} muestra que la presencia de células de Cajal Retzius es necesaria para la formación de la fisura del HC. La falta de la fisura conduce a graves malformaciones del HC. Al estar unidas las capas moleculares del asta de Amón y el GD, se desdibujan los límites entre territorios adyacentes pero separados, lo cual muestra que la fisura del HC, aunque en gran medida obliterada, es un eje anatómico fundamental para la correcta funcionalidad de este centro. Las células de Cajal Retzius son necesarias para el correcto establecimiento de las conexiones del HC (Del Río et al., 1997; Frotscher et al., 2003), y su falta produce tanto alteraciones anatómicas como funcionales. Aunque el tema conductual excede el marco de esta tesis, queremos mencionar que el ratón p73^{-/-} tiene graves defectos de memoria y aprendizaje. (El ratón p73^{-/-} sigue siendo nuestro tema de investigación, y estamos en proceso de determinar, mediante el análisis de ratones knockout selectivos, cual de las isoformas de p73 es la más importante para el desarrollo del HC).

Además, la presencia de células de Cajal Retzius está relacionada con el correcto desarrollo del “esqueleto” (*scaffold*) glial radial (defectuoso en el ratón p73^{-/-}) y, por lo tanto, con el correcto desarrollo del hilio del HC donde asienta la tercera matriz del dentado. El papel de las células de Cajal Retzius en el establecimiento del *scaffold* glial radial del hilio está documentado desde la década pasada (Frotscher et al, 2003; Weiss et al, 2003; Brunne et al, 2010; Brunne et al 2013). El potencial papel de la fisura del HC como inductora del desarrollo diferencial del HC se ve reforzado por la demostración de que la fisura funciona como nicho neurogénico nestina + incluso en ratones adultos, donde participa en la regeneración después de una noxa (Zhang et al., 2014). Otro factor que interviene en el desarrollo del HC es el factor de transcripción Tbr2 que es necesario para la correcta migración de células excitatorias a lo largo de la fisura del HC y para la neurogénesis en el GD (Hodge et al., 2013). El ratón mutante Tbr2^{-/-} tiene una cantidad de células de Cajal Retzius normales pero que no migran lo suficiente y en el que se genera una malformación y malrotación en la fisura, que está presente, aunque hipoplásica. Serán necesarios estudios embrionarios adicionales en animales experimentales para determinar la interacción entre p73 y otros factores de transcripción y el papel de estas interacciones en la formación de la fisura del HC.

V. Otros factores involucrados en el desarrollo de la fisura del hipocampo. La vía SDF1-CxCR4

En el desarrollo del HC humano podemos constatar que la mayor profundización de la fisura coincide con la mayor cantidad de células de Cajal Retzius a partir de las 14 SG. Las neuronas de Cajal Retzius pueden estar implicadas en un fenómeno que relaciona la profundización de la fisura del HC con la gran cantidad de tejido conectivo vascular y la existencia de sistemas anastomóticos arteriales en la piamadre adyacente a la misma. Se ha descrito un sistema de comunicación molecular entre las células de Cajal Retzius y la piamadre: La citoquina Cxcl-12 / SDF 1 (Guyon y Nahon, 2007), producida por las meninges regula la morfogénesis del HC a través de su receptor CXCR-4 que se encuentra, entre otras poblaciones, en las células de Cajal Retzius (Stumm et al., 2003). La disposición aleatoria y la escasez de precursores GFAP⁺ en el HC de los ratones Cxcr4^{-/-} apoya esta idea; no se forma la corriente migratoria del dentado como una masa de células en desplazamiento sino como grupos de células no compactos. Sin embargo no existe una disminución de la cantidad de células granulares, sino los granos recién nacidos se acumulan anormalmente en torno a la unión fimbriodentada, como si al verse separados de la superficie pial se indujera su diferenciación prematura (Bagri et al., 2002; Lu et al., 2002; Borrell y Marin, 2006; Li et al., 2008; Lopez-Bendito et al., 2008; Paredes et al., 2006; Tiveron et al., 2006; Berger et al, 2007). Esto

sugiere un papel inductor de la piamadre sobre las células de Cajal Retzius, que serían las implicadas en la formación de la fisura del HC.

Las meninges del feto humano son mucho más prominentes que las del ratón, y la vascularización humana también tiene una magnitud mucho mayor. No es sorprendente que el posible papel inductor de las meninges y de sus vasos sobre la formación de la fisura del HC haya pasado desapercibido en los estudios en roedores. Nuestras imágenes a la edad de 14-16 SG sugieren un papel activo de las meninges – quizás mediante la señal SDF1/CxCr4, pero quizás también por otros factores- en la profundización de la fisura del HC.

La rica irrigación del HC v humano está a cargo de un conjunto de arterias importantes que al mismo tiempo se encargan de la intensa perfusión del plexo coroideo: la a. coroidea anterior, y ramas hipocampales y coroideas de la a. cerebral posterior (Duvernoy, 2012) . La gran cantidad de tejido conectivo vascular meníngeo en esta región sería otro factor a tener en cuenta a la hora de explicar la prominencia del HC v humano. Queremos destacar también que la irrigación de las zonas corticales dorsales al cuerpo calloso está a cargo de ramas de la a. cerebral anterior y de la a. cerebral posterior que no emiten ramas directas para los plexos coroideas. La irrigación diferencial del HC d transitorio y del HC v persistente podría jugar un papel en el gran desarrollo ulterior del HC v.

Está demostrado que existe relación entre los vasos sanguíneos y la zona subgranular en la que se produce la neurogénesis adulta (la tercera matriz del dentado) (Palmer et al., 2000) y, de forma más general, que hay relación entre la vascularización y la neurogénesis (Shen et al., 2004). Existiría, por tanto, un mecanismo que podría correlacionar la vascularización específica del HC v con la existencia de una fisura profunda y compleja, ocupada por la gran cantidad de células de Cajal Retzius. Esto, en su conjunto, también permitiría una rica neurogénesis en el GD en su fase de matriz secundaria y terciaria. La ausencia de estos mecanismos en el HC d, junto con el desarrollo del cuerpo calloso, provocaría su involución a lo largo del segundo trimestre del embarazo.

VI. La arquitectura del extremo uncal del hipocampo. Transición entre hipocampo y estructuras adyacentes.

Una de las limitaciones del presente estudio es la imposibilidad de discriminar en edades tempranas entre asta de Amón y GD, y el resto de las estructuras de la formación hipocampal (incluyendo *subiculum*, *presubiculum*, *prosubiculum*, *parasubiculum*). Esta dificultad se debe en parte a la inmadurez de la estructura histológica y la escasa delimitación de las fronteras en los distintos territorios (Yang et al., 2014), pero también a la poca disponibilidad de macadores específicos para

estas zonas (Ding, 2013). En nuestro material resulta prácticamente imposible detectar la transición entre CA1 y el *subiculum* antes de la 21 SG, aunque otros autores detectan este límite aproximadamente un mes antes en la gestación (Cipriani et al., 2015). No obstante, en regiones como la cabeza del HC es necesario comentar brevemente la relación del HC con estructuras alocorticales adyacentes.

La compleja arquitectura de esta región en humanos y primates ha llevado a notables confusiones con respecto a la nomenclatura. Las regiones equivalentes al *subiculum* y CA1 en el uncus se delimitan atendiendo a sus posiciones topográficas, dado que citoarquitectónicamente se delimitan mal entre sí, aunque muestran características que les diferencian de las regiones equivalentes en el resto del HC (Carmichael y Price, 1995). En gran parte de la literatura la denominación es CA1' o Sub', o se habla de *subiculum* modificado y de asta de Amón modificada (Barbas y Blatt, 1995; Rosene y van Hoesen, 1987). En las secciones coronales más rostrales de la zona uncal la primera estructura en aparecer es el HATA, una zona que se tiñe intensamente y cuyas células parecen encontrarse más densamente empaquetadas que las el asta de Amón. El HATA se sitúa medio-dorsalmente a CA1 y el *subiculum*. El extremo anterior del HC en desarrollo está en contigüidad con el HATA y se compone de *subiculum* y *presubiculum* (Ding, 2015). Conforme se avanza hacia niveles más posteriores se establece una continuidad secuencial entre HATA, *prosubiculum*, *subiculum*, CA1, *prosubiculum*, *subiculum*, *presubiculum*, *parasubiculum* y la corteza entorrinal (Duvernoy, 2012). Estas características se aprecian con dificultad en los fetos de finales del segundo trimestre, aunque son análogas a las presentes en el humano adulto, así como en otros primates (Ding, 2013). Llama la atención la aparición temprana de formaciones glomeruloides en el *presubiculum*, que podrían corresponde a lo que en el humano adulto se ha llamado lámina principal externa (Rosene y van Hoesen, 1987).

Hay una serie de marcadores moleculares e inmunohistoquímicos tales como SMI-32, neurotensina, tirosina hidroxilasa, htr2c o gfra1 que sería útiles para la demarcación correcta de estos territorios en el desarrollo embrionario e interesantes para la comprensión de la formación de la cabeza del HC (Ding y van Hoesen, 2010; Ding, 2015).

Por último, es interesante señalar la girificación de la cabeza del HC como una característica propia del humano y, de forma atenuada, de algunos primates antropomorfos filogenéticamente próximos. La cabeza del HC destaca por la presencia de auténticas circunvoluciones de forma paralela a lo que acontece en la neocorteza (véase Brainmuseum.org). Desafortunadamente, parece que no existe ningún modelo animal para estudiar esta peculiaridad del HC humano. Otro factor diferencial es la

presencia de un hilio complejo en la cabeza del HC v. La importancia evolutiva del hilio en humanos queda demostrada por la existencia de un tracto de fibras mielinizadas no observado en otras especies (Li et al, 1997; Parekh et al, 2015), y el amplio hilio de la cabeza del HC podría estar relacionado con funciones cognitivas, más evolucionadas del humano.

VII. La migración del dentado en el desarrollo fetal humano.

Ante la barrera ética y metodológica que supone la investigación con material humano, y dado que es imposible la realización de estudios experimentales, hemos optado por tratar de replicar los estudios de Altman y Bayer (1990, a-e) usando marcadores inmunohistoquímicos de proliferación celular habituales en patología, tales como el PCNA que proporcionan un marco válido para el estudio del GD fetal humano. Con estos marcadores distinguimos tres componentes en el desarrollo del GD que son equiparables a los descritos en otros modelos. Una **primera matriz del dentado** es su neuroepitelio primitivo, situado en la zona ventricular alrededor de una escotadura llamada el *notch* (Bayer y Altman 2005). La **segunda matriz del dentado** es la corriente de células proliferativas en migración que se extiende desde la zona ventricular hasta la superficie pial. Tiene un componente parafimbrial que corre a lo largo de la frontera entre la fimbria y el rudimento hipocampal, y un componente subpial que recorre la superficie “libre” del HC a lo largo de la piamadre de la fisura. Formará los dos brazos del GD y se mantiene activa durante la primera mitad del segundo trimestre. La **tercera matriz** se desprende de la segunda y se extiende por el hilio del hipocampo para después formar la capa subgranular.

Las tres matrices de desarrollo del dentado humano se correlacionan con las tres matrices de desarrollo del dentado de los roedores y primates establecidos mediante marcaje con timidina tritiada (Altman y Bayer, 1990, d y e; Nowakowski y Rakic, 1981). A su vez, en modelos animales se ha demostrado una correlación funcional o molecular que vincula la migración del dentado a las neuronas de Cajal Retzius y a las meninges de la fisura, a través de la vía SDF 1/ CxCR 4 mencionada antes, expresada en las leptomeninges y las neuronas de Cajal Retzius (Li et al., 2009). Reelin en las células de Cajal Retzius interviene en la formación del *scaffold* glial radial a través de la vía Reelin – Dab1 (Förster et al., 2002; Frotscher et al., 2003; Weiss et al, 2003; Abraham et al., 2004). Por último se produce un tránsito desde la zona subpial al hilio que en roedores sucede en los primeros días de la vida postnatal y en humanos durante el segundo trimestre

del desarrollo. Este tránsito está mediado por la vía de Wnt y Shh (Machold et al., 2003; Li et al., 2009).

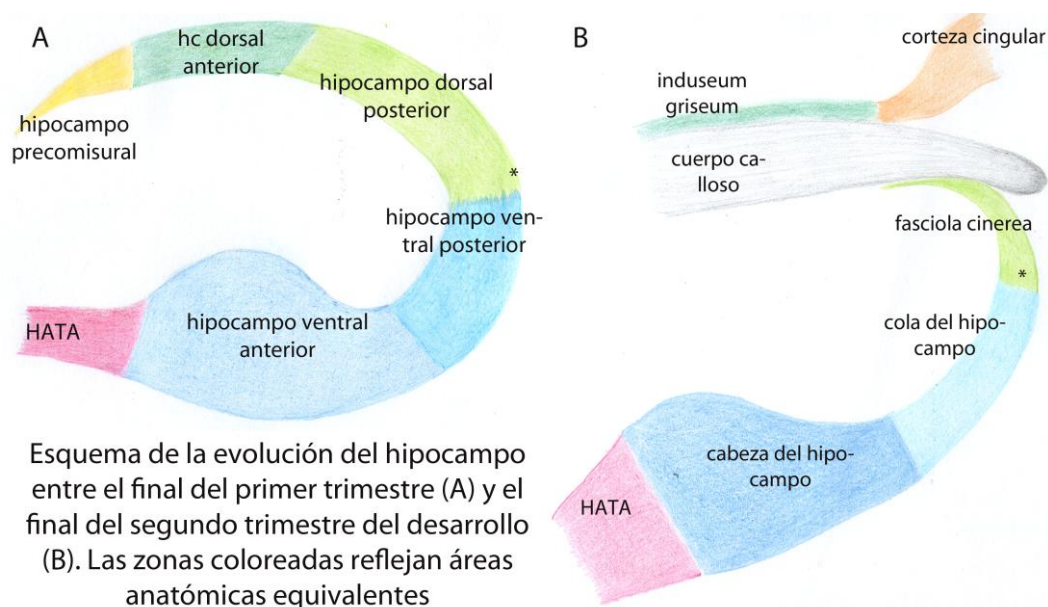
Es imprescindible resaltar la importancia del complejo fimbria – plexo coroideo en el desarrollo del GD. El GD tiene una extensión rostro-caudal inferior a la del asta de Amón, y no se forma en niveles donde no hay fisura coroidea con plexo coroideo conectado. No existe *dentate notch* ni segunda matriz del dentado en los niveles anteriores a la unión fimbrio - dentada en la cabeza del HC, a pesar de que estas regiones sí poseen matriz terciaria que migra desde niveles más caudales hacia el uncus, para establecer las complejas digitaciones de la banda de Giacomini. En el HC dorsal tampoco se identifica una segunda matriz del dentado en las regiones anteriores al nivel del complejo fimbria – plexo coroideo. La estrecha relación entre plexo coroideo y GD no se ha destacado hasta ahora, y pensamos que sería un campo potencialmente interesante para futuros trabajos de investigación.

VIII. La arquitectura del hipocampo en desarrollo. Hipocampo dorsal y ventral

Una de las conclusiones más novedosas de esta tesis es la definición de un HC d en su mayor parte transitorio, y de un HC v persistente. Durante la vida fetal, HC d e HC v confluyen en un nivel posterior, donde en cortes coronales teñidos con violeta de cresilo las capas principales del asta de Amón y el GD constituyen una formación cruciforme análoga a la que en ratones marca la frontera entre el HC v y HC d, tanto desde el punto de vista morfológico como en lo referente a la expresión génica (Lowe et al, 2015; Pofantis et al., 2015) (ver figura 93). Esta formación cruciforme persiste después de la degeneración del HC d y conecta el HC v y la *fasciola cinerea* en la región retrosplenial. Basándonos en las variaciones en la composición anatómica del HC fetal a lo largo de su eje septo-uncal, diferenciamos seis regiones con comportamientos distintos:

- A) *El hipocampo precomisural*: carece completamente de primordio del GD y conexión con el plexo coroideo. Su único componente reconocible es un esbozo de placa Amónica CB+. Se continúa en sentido ventral con el *septum* y en dirección rostral con la *tenia tecta*.
- B) *Hipocampo dorsal anterior*: Existe una placa Amónica CB+ que se continúa con un primordio del GD CR +. Este a su vez conecta con la fimbria, que a su vez está unida al plexo coroideo. El HC d anterior se define por la presencia de una segunda matriz del dentado que no evoluciona a tercera matriz. Carece de esqueleto glial radial y la fisura del HC no profundiza. Esta región del HC d desaparece en el segundo trimestre y queda sustituida por el cuerpo calloso.

- C) *Hipocampo dorsal posterior*: Se sitúa debajo del cuerpo calloso y en la zona retroesplenial. En él se identifica una segunda matriz del dentado a lo largo del segundo trimestre y, a finales del mismo, existe ya la tercera matriz en el hilio del dentado. Conecta con el HC v mediante la cruz del hipocampo y persiste unido al mismo formando la *fasciola cinerea*. Pensamos que puede haber diferencias individuales en el desarrollo o la persistencia de esta porción. En el Allen atlas del hombre adulto (láminas 66 a 71, ver resultados) hemos identificado una región cruciforme que no habíamos observado en nuestro propio material.
- D) *Hipocampo ventral posterior*. Muestra segunda y tercera matriz a lo largo del segundo trimestre. Persiste como cola del HC.
- E) *Hipocampo ventral anterior*. A finales del primer trimestre y en las primeras semanas es un área ensanchada: la eminencia hipocampal. Desarrolla varias matrices secundarias durante el segundo trimestre del embarazo y, a lo largo de la segunda mitad del mismo, se girifica intensamente. Dará lugar a la parte posterior de la cabeza del HC.
- F) *Zona uncal*. Comprende en su parte anterior la HATA, *subiculum* y asta de Amón de la parte anterior de la cabeza del HC, pero carece de matriz secundaria del dentado. Las digitaciones del dentado (Banda de Giacomini) se formarían desde la matriz terciaria del HC v anterior.



Esquema 4: Parcelación regional del hipocampo en desarrollo al final del primer trimestre (izquierda) y del segundo trimestre (derecha)

Esta parcelación nos permite establecer áreas en función de su comportamiento durante el segundo trimestre y también establece una base, aunque limitada, para la anatomía comparada entre el humano y modelos animales de experimentación. Una de las principales conclusiones que se pueden obtener del seguimiento del desarrollo hipocampal es la existencia de una continuidad entre el HC d y el HC v, que se reconoce fácilmente en el ratón. En el punto de continuidad no existe fisura del HC y CA3 penetra masivamente en el hilio dorsal y ventral. La imagen histológica, en secciones sagitales y horizontales (figura 94), es de estructura en forma de cruz, X, (figura 94) o aspas; por esta razón hablamos de la “cruz del hipocampo”. De esta manera, aunque el HC es una estructura única, se compone de una porción dorsal y ventral que se fusionan; estas porciones en su inicio estarían bajo el control de centros de señalización diferentes, de un hem dorsal y un hem ventral.

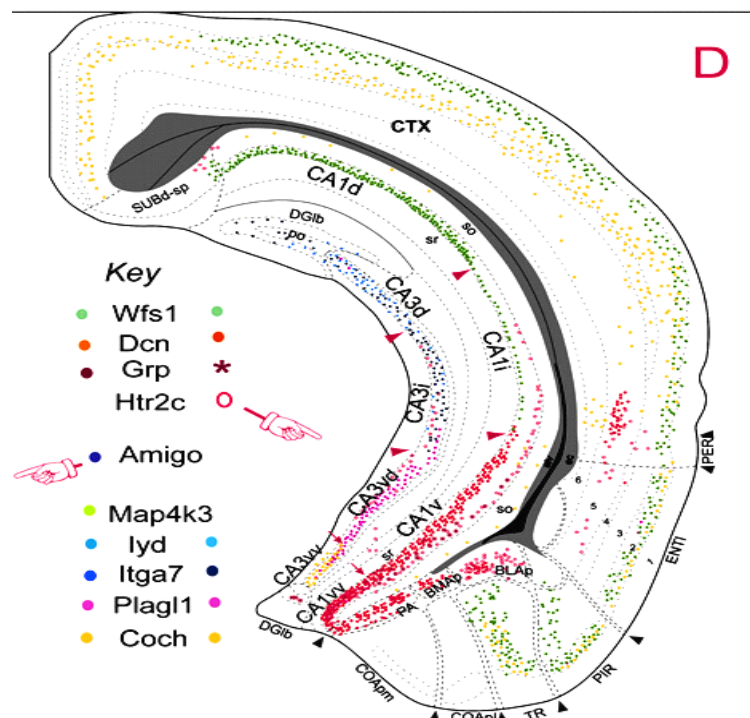


Figura 93. Expresión génica en las diversas regiones del hipocampo, en el nivel de la cruz hipocampal (Fanselow y Dong, 2010).

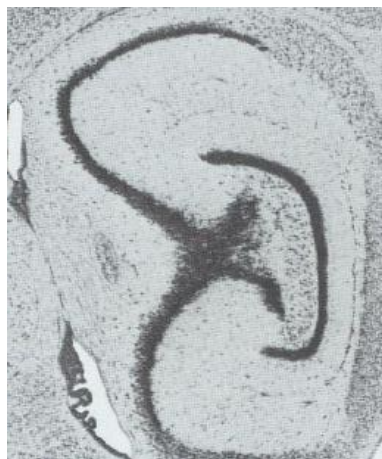


Figura 94. La cruz del hipocampo murino en una sección sagital (adaptado de Paxinos y Franklin, 2001)

Esta fusión depende en cierta medida de la fisura del HC, que adquiere así un papel importante que determina la organización del dentado. Esto se demuestra en el modelo de ratón *p73* ^{-/-}, donde esta fusión está alterada.

La cruz del HC no se cita en la literatura sobre el HC humano. No obstante, este límite morfológico existe en los fetos humanos, tal y como demuestran las reconstrucciones tridimensionales realizadas mediante la superposición de secciones histológicas. A las 21 SG esta estructura permanece a pesar de la degeneración de la mayor parte del HC d. Entre la 25 y la 27 SG la cruz del HC ha desaparecido como tal, pero en su lugar sigue existiendo una conexión entre el HC v y la *fasciola cinerea*.

Aunque son estructuras diferentes desde el punto de vista ontogénico, el HC d y el HC v son, por tanto, una única estructura desde el punto de vista morfológico. La cruz del HC es un importante centro de simetría y llama la atención la escasa literatura al respecto. Las escasas menciones que existen en la literatura usan la expresión “X- shaped structure”. No obstante, el trabajo importante de Faselow y Dong (2010) aporta una valiosa información al demostrar que la cruz del HC murino no es solamente una frontera morfológica sino también funcional y de expresión génica. Una de las características más llamativas de la cruz del HC humano en desarrollo es la presencia de una gran región hiliar. Ya mencionamos que el hilio del HC es una región de gran importancia en el humano, que muestra un tamaño comparativamente mucho mayor que en roedores (Lim et al., 1997) y donde se origina un tracto mielinizado exclusivo de humanos (Parekh et al., 2015).

En relación con el desarrollo diferencial del HC v humano es necesario subrayar la inadecuación de la mayor parte de los estudios, tanto morfológicos como funcionales (incluido electrofisiológicos) que se realizan sobre modelos en rata o ratón, dado que en estos animales el HC d domina sobre el ventral. Los modelos animales más útiles serían, en todo caso, los primates antropomorfos, cuyos

HC comparten más similitudes ontogénicas con el humano. A partir del trabajo de Fanselow y Dong (2010) han aparecido numerosos estudios que describen importantes diferencias funcionales entre el HC d e HC v del roedor (p.ej, Schmidt et al., 2013; Dougherty et al., 2013). El HC d parece tener una mayor implicación en la memoria espacial (Pothuizen et al., 2004), mientras que el HC v juega un papel en la memoria afectiva (Ballesteros et al., 2014). Como mostramos en nuestra tesis, el HC d humano desaparece casi totalmente; las diferencias que se describen a lo largo del eje longitudinal del HC humano se refieren a la parte posterior del HC, más próxima a las áreas parietales con funciones espaciales, mientras que su parte rostral, mas cerca del uncus y de la amígdala, puede jugar un papel en actividades emocionales (Jasarevic et al., 2014). En todo caso, el HC humano es una estructura que deriva ontogenéticamente del HC v, y los términos de HC d e HC v tienen un significado diferente que en el roedor. Como ya expusimos en la introducción de esta tesis, el roedor no es el mejor modelo para el estudio del cerebro humano.

IX. El cerebro humano como paradigma de desarrollo hipocampal

Una de las conclusiones más importantes de este proyecto es la necesidad de estudio pormenorizado de la morfología del cerebro humano en desarrollo para poder realizar una adecuada correlación con modelos animales. La ausencia casi completa de HC d en el hombre y la sorprendente cantidad de literatura sobre el HC d del ratón son, en cierta manera, un ejemplo de este problema. Animales con neocorteza y arquicorteza girificadas y regionalizadas de una manera comparable con el hombre supondrían modelos mucho más útiles a la hora de extrapolar los resultados, a pesar de las dificultades metodológicas obvias, (al respecto ver también Medina et al, 2013).

Una pregunta que nos hicimos constantemente durante el este trabajo de tesis es: ¿Hasta qué punto podemos comparar los datos obtenidos en el roedor, sobre todo el ratón que ha llegado a dominar la neurociencia, con los pocos datos de los que disponemos en el humano? El ratón es un pequeño roedor nocturno que se orienta básicamente por el olfato y el tacto de sus vibrisas, con un repertorio cognitivo extremadamente limitado. Se ha propuesto recientemente que el ancestro común de los mamíferos era un animal de tamaño mediano con un cerebro ligeramente girificado, y que el ratón representaría una lisencefalia secundaria y un proceso de miniaturización (O'Leary et al., 2013; Kelava et al., 2013). Al aceptar los modelos experimentales de manipulación génica del ratón nos basamos en los criterios de Manns y Eichenbaum (2006) que destacan a consistencia y conservación de la anatomía del HC y de sus circuitos básicos en la mayoría de los mamíferos. La diferencia fundamental, según estos autores, estriba en las aferencias de la corteza entorrinal, a su vez el origen de la vía perforante y fuente principal de información al HC (figura 95). En el humano, la enorme

extensión de la isocorteza, con sus grandes y variadas áreas de asociación, proyectaría a la corteza entorrinal, y ésta procesa y transmite la información a los circuitos hipocampales. En especies animales con una organización isocortical más limitada a información sensorial y menos procesada, esta información también converge en la corteza entorrinal, y finalmente entraría en los circuitos del HC. Concluimos que la información que llega al HC humano es inmensamente más rica y elaborada que la que llegaría a un HC murino. Con este concepto en mente, aceptamos el modelo del ratón y sus manipulaciones génicas para establecer comparaciones y elaborar hipótesis sobre el HC humano. Una limitación adicional al estudio de la embriología humana es la obtención de muestras.

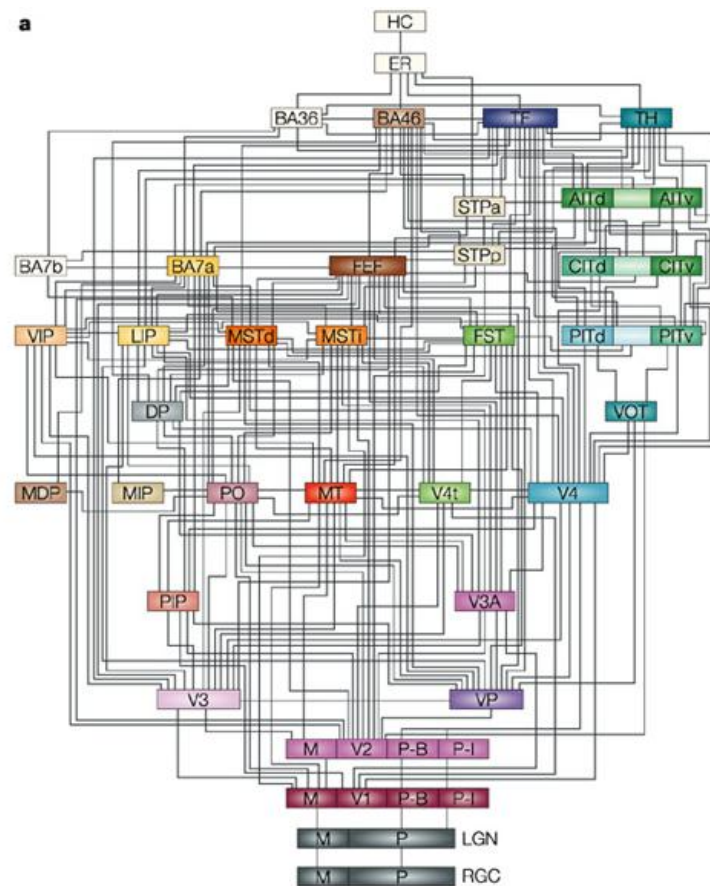


Figura 95. La conectividad de la corteza visual del macaco. A pesar de la enorme complejidad de las conexiones recíprocas entre 132 áreas corticales y las divertas estaciones visuales subcorticales y corticales no visuales (más de 175), el sistema se encuentra dominado por una conexión unívoca entre la corteza entorrinal y el hipocampo. Esta jerarquización está conservada en varios sistemas funcionales. Filogenéticamente, existe variación entre especies pero, de nuevo, la conexión entre hipocampo y corteza entorrinal es universal (Modificado de Rees et al, 2002).

La escasa coordinación con los servicios de Obstetricia que practican abortos conlleva muchos retrasos e inconvenientes y limita la posibilidad de realizar estudios de conectividad o sinaptogénesis en material no fijado en formol. Por otra parte, la ausencia de pautas claras de procesamiento

macroscópico para las muestras fetales en los servicios clínicos de Anatomía Patológica conduce frecuentemente a un inadecuado aprovechamiento de las mismas debido a la existencia de protocolos de tallado o fijación que resultan destructivos o inadecuados para los frágiles cerebros embrionarios y fetales.

Una adecuada comunicación entre los profesionales de la investigación básica y los que dedican su vida a la asistencia (o, preferentemente, un adecuado solapamiento entre ambas facetas de la medicina y la biología modernas) permitiría mantener el foco de la investigación básica a la vez que produciría mejoras a medio plazo en la calidad asistencial.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Establecemos la cronología de la aparición diferencial de un hipocampo dorsal y de un hipocampo ventral, como derivados de un cortical hem dorsal y ventral, respectivamente, y unidos en su polo posterior.
2. Establecemos cuatro períodos en la ontogénesis del hipocampo: período de transición hem- hipocampo, entre las 9 y 11 SG, período de coexistencia de un hipocampo dorsal y un hem ventral 11-12 SG, un periodo de simetría entre hipocampo dorsal y ventral a las 12/13 SG, período de diferenciación ventral y regresión del hipocampo dorsal entre las 14 y 21 SG y por último un periodo de diferenciación de la cabeza del hipocampo.
3. Definimos cinco regiones en el hipocampo humano fetal: la región precomisural que carece de giro dentado y desaparece, la región dorsal anterior que carece de tercera matriz del dentado y se transforma en el *induseum griseum*, la región dorsal posterior que posee tercera matriz del dentado y permanece unida al hipocampo ventral mediante la cruz del hipocampo formando la *fasciola cinerea*, la región ventral posterior que forma la cola del hipocampo y la región ventral anterior que forma la cabeza del hipocampo. La cabeza la subdividimos en una región uncal anterior, formada por el HATA, *subiculum/presubiculum* y Asta de Amón, y una región uncal posterior, que posee segunda matriz del giro dentado.
4. A partir de las 12/13 SG observamos un engrosamiento del primordio hipocampal ventral anterior que denominamos eminencia hipocampal. Esta da lugar al área de transición hipocampo amigdalal y la cabeza del hipocampo que adquiere una complejidad y posterior girificación característica del humano.
5. Identificamos en el humano las mismas fases de migración del giro que las descritas para modelos de roedor con tres componentes: una primera matriz en la zona ventricular, una segunda matriz formada por una corriente migratoria desde la zona ventricular hasta la superficie pial y finalmente una tercera matriz en el hilio del dentado.

6. En la región uncal posterior se generan varias matrices secundarias del dentado que invaden la cabeza del hipocampo de caudal a rostral, dando lugar a la banda de Giacomini.
7. La migración secundaria del giro dentado tiene lugar exclusivamente donde existe conexión entre hipocampo, fimbria y plexo coroideo.
8. Relacionamos el desarrollo diferencial del hipocampo ventral humano con la presencia de células de Cajal-Retzius p73/Reelin- positivas en la fisura hipocampal ventral, así como con la prominente vascularización de la fisura y la existencia de un *scaffold* glial radial del giro dentado.
9. Describimos el hipocampo del ratón KO p73 que carece de células de Cajal-Retzius y como consecuencia no forma una fisura del hipocampo.
10. Todos los componentes del ratón mutante están malformados: el asta de Amón está lobulado y el giro dentado carece de hoja infrapiramidal.
11. La reconstrucción tridimensional muestra un hipocampo dorsal y un hipocampo ventral que se continúan mediante una estructura cruciforme formada por una rama común de CA3. Esto aporta un sustrato morfológico para la división entre hipocampo dorsal e hipocampo ventral, hasta ahora sólo descrito desde el punto de vista conductual y de la expresión génica.
12. Mostramos que p73 es necesaria para la correcta conformación espacial del hipocampo.
13. Las pruebas de aprendizaje condicionado revelan que la ausencia de la fisura del hipocampo generan un déficit funcional.

BIBLIOGRAFÍA

- Ables JL, Breunig JJ, Eisch AJ, Rakic P. Not(ch) just development: Notch signalling in the adult brain. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12:269-83
- Abraham H, Meyer G. Reelin-expressing neurons in the postnatal and adult human hippocampal formation. *Hippocampus*. 2003; 13:715-27.
- Abraham H, Pérez-García CG, Meyer G. p73 and Reelin in Cajal-Retzius cells of the developing human hippocampal formation. *Cereb Cortex*. 2004 :484-95.
- Abrahám H, Veszprémi B, Kravják A, Kovács K, Gömöri E, Seress L. Ontogeny of calbindin immunoreactivity in the human hippocampal formation with a special emphasis on granule cells of the dentate gyrus. *Int J Dev Neurosci*. 2009 ;27:115-27
- Abraham WC, Mason-Parker SE, Bear MF, Webb S, Tate WP. Heterosynaptic metaplasticity in the hippocampus in vivo: a BCM-like modifiable threshold for LTP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:10924-9.
- Abu-Khalil A, Fu L, Grove EA, Zecevic N, Geschwind DH. Wnt genes define distinct boundaries in the developing human brain: implications for human forebrain patterning. *J Comp Neurol*. 2004; 474: 276-88.
- Aggleton JP. A description of the amygdalo-hippocampal interconnections in the macaque monkey. *Exp Brain Res*. 1986; 64:515-26.
- Aggleton JP, Vann SD, Saunders RC. Projections from the hippocampal region to the mammillary bodies in macaque monkeys. *Eur J Neurosci*. 2005; 22:2519-30.
- Aimone JB, Deng W, Gage FH. Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. *Neuron*. 2011; 70:589-96.
- Alonso JR, Frotscher M. Hippocampo-septal fibers terminate on identified spiny neurons in the lateral septum: a combined Golgi/electron-microscopic and degeneration study in the rat. *Cell Tissue Res*. 1989; 258:243-6.
- Alonso A, Köhler C. Evidence for separate projections of hippocampal pyramidal and non-pyramidal neurons to different parts of the septum in the rat brain. *Neurosci Lett*. 1982;31:209-14.
- Alpers JB, Berry R., Paddison RM. Anatomical studies of the circle of Willis in normal brain. *Arch Neurol Psychiatr* 1959; 81:409-418.
- Altman J, Bayer SA. Postnatal development of the hippocampal dentate gyrus under normal and experimental conditions. En RL Isaacson & KH Pribram (eds) "The hippocampus" (vol I: Structure and Development). Plenum Press. New York, London, 1975; pp: 95-122.
- Altman J, Bayer SA. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J Comp Neurol*. 1990; 301:365-81.

Altman J, Bayer SA. Prolonged sojourn of developing pyramidal cells in the intermediate zone of the hippocampus and their settling in the stratum pyramidale. *J Comp Neurol.* 1990 ;301:343-64.

Altman J, Bayer SA. Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells. *J Comp Neurol.* 1990; 301:325-342.

Altman J, Bayer SA. Horizontal compartmentation in the germinal matrices and intermediate zone of the embryonic rat cerebral cortex. *Exp Neurol.* 1990;107:36-47.

Altman J, Bayer SA. Vertical compartmentation and cellular transformations in the germinal matrices of the embryonic rat cerebral cortex. *Exp Neurol.* 1990 ;107:23-35.

Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.* 1965;124:319-35.

Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol.* 1966 ;126(3):337-89.

Altman J, Das GD. Postnatal neurogenesis in the guinea-pig. *Nature.* 1967; 214:1098-101.

Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM, Tramontin AD. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2:287-93

Amaral DG. A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol.* 1978; 182:851-914.

Amaral DG, Cowan WM. Subcortical afferents to the hippocampal formation in the monkey. *J Comp Neurol.* 1980;189:573-91.

Amaral DG, Dent JA. Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J Comp Neurol.* 1981;195:51-86.

Amaral DG, Dolorfo C, Alvarez-Royo P. Organization of CA1 projections to the subiculum: a PHA-L analysis in the rat. *Hippocampus.* 1991 Oct;1(4):415-35.

Amaral DG, Insausti R, Cowan WM. The commissural connections of the monkey hippocampal formation. *J Comp Neurol.* 1984; 224:307-36.

Amaral DG, Kondo H, Lavenex P. An analysis of entorhinal cortex projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subiculum of the neonatal macaque monkey. *J Comp Neurol.* 2014; 522:1485-505.

Amaral DG, Kurz J. An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol.* 1985; 240:37-59.

Amaral DG, Kurz J. The time of origin of cells demonstrating glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivity in the hippocampal formation of the rat. *Neurosci Lett*. 1985; 59:33-9.

Amaral DG, Witter MP. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*. 1989; 31:571-91.

Amat Muñoz P, Ssmith-Agreda , JM (eds). Escolar. Anatomía humana funcional y aplicativa (vol. 1) (5ª ed.) Espaxs, Barcelona 2007.

Andersen P. Organization of hippocampal neurons and their interconnections. En RL Isaacson & KH Pribram (eds) "The hippocampus" (vol I: Structure and Development). Plenum Press. New York, London, 1975; pp:155-175.

Andersen P, Bliss TV, Skrede KK. Lamellar organization of hippocampal pathways. *Exp Brain Res*. 1971; 13:222-38.

Angevine JB Jr. Time of neuron origin in the hippocampal region. An autoradiographic study in the mouse. *Exp Neurol Suppl*. 1965; 2:1-70.

Angevine JB Jr. Development of the hippocampal región. En RL Isaacson & KH Pribram (eds) "The hippocampus" (vol I: Structure and Development). Plenum Press. New York, London, 1975; pp:61-94.

Arantius JC. *Anatomicarum observationum liber, ac de tumoribus secundum locos affectos liber*. Venecia: Ed. Apud Lacobum Brechtanum; 1587.

Arnold SE, Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR. Some cytoarchitectural abnormalities of the entorhinal cortex in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 1991; 48:625-32.

Arnold SE, Trojanowski JQ. Human fetal hippocampal development: I. Cytoarchitecture, myeloarchitecture, and neuronal morphologic features. *J Comp Neurol*. 1996; 367:274-92.

Arnold SE, Trojanowski JQ. Human fetal hippocampal development: II. The neuronal cytoskeleton. *J Comp Neurol*. 1996; 367:293-307.

Augustinack JC, van der Kouwe AJ, Salat DH, Benner T, Stevens AA, Annese J, Fischl B, Frosch MP, Corkin S. H.M.'s contributions to neuroscience: a review and autopsy studies. *Hippocampus*. 2014;24:1267-86.

Babb TL. Bilateral pathological damage in temporal lobe epilepsy. *Can J Neurol Sci*. 1991; 18(4 Suppl):645-8.

Bachevalier J, Vargha-Khadem F. The primate hippocampus: ontogeny, early insult and memory. *Curr Opin Neurobiol*. 2005; 15:168-74.

- Baddeley A. Working memory: theories, models, and controversies. *Annu Rev Psychol.* 2012;63:1-29
- Baddeley A, Jarrold C, Vargha-Khadem F. Working memory and the hippocampus. *J Cogn Neurosci.* 2011; 23(12):3855-61.
- Bagri A, Gurney T, He X, Zou YR, Littman DR, Tessier-Lavigne M, Pleasure SJ The chemokine SDF1 regulates migration of dentate granule cells. *Development.* 2002; 129:4249-60.
- Bai H, Suzuki Y, Noda T, Wu S, Kataoka K, Kitada M, Ohta M, Chou H, Ide C. Dissemination and proliferation of neural stem cells on the spinal cord by injection into the fourth ventricle of the rat: a method for cell transplantation. *J Neurosci Methods.* 2003; 124:181-7.
- Ballesteros CI, de Oliveira Galvão B, Maisonette S, Landeira-Fernandez J. Effect of dorsal and ventral hippocampal lesions on contextual fear conditioning and unconditioned defensive behavior induced by electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray. *PLoS One.* 2014 Jan 3;9(1):e83342
- Barbas H, Blatt GJ. Topographically specific hippocampal projections target functionally distinct prefrontal areas in the rhesus monkey. *Hippocampus.* 1995; 5: 511-33.
- Bayer SA. Quantitative 3H-thymidine radiographic analyses of neurogenesis in the rat amygdala. *J Comp Neurol.* 1980;194(4):845-75.
- Bayer SA. Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography. *J Comp Neurol.* 1980; 190:87-114.
- Bayer SA. Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. *J Comp Neurol.* 1980 ;190:115-34.
- Bayer SA. Neuron production in the hippocampus and olfactory bulb of the adult rat brain: addition or replacement? *Ann N Y Acad Sci.* 1985; 457:163-72.
- Bayer S, Altman J. *Atlas of Human Central Nervous System Development.* CRC Press, Boca Raton 2005.
- Bekiari C, Giannakopoulou A, Siskos N, Grivas I, Tsingotjidou A, Michaloudi H, Papadopoulos GC. Neurogenesis in the septal and temporal part of the adult rat dentate gyrus. *Hippocampus.* 2015;25:511-23.
- Ben-Ari Y, Khalilov I, Represa A, Gozlan H. Interneurons set the tune of developing networks. *Trends Neurosci.* 2004;27:422-7.
- Benes FM. Myelination of cortical-hippocampal relays during late adolescence. *Schizophr Bull.* 1989; 15:585-93.

- Benson CB, Doubilet PM Sonographic prediction of gestational age: accuracy of second- and third-trimester fetal measurements. *Am J Roentgenol.* 1991;157:1275-7
- Berger O, Li G, Han SM, Paredes M, Pleasure SJ. Expression of SDF-1 and CXCR4 during reorganization of the postnatal dentate gyrus. *Dev Neurosci.* 2007; 29:48-58.
- Berger TW, Semple-Rowland S, Basset JL. Hippocampal polymorph neurons are the cells of origin for ipsilateral association and commissural afferents to the dentate gyrus. *Brain Res.* 1981; 215:329-36.
- Bielle F, Griveau A, Narboux-Nême N, Vigneau S, Sigrist M, Arber S, Wassef M, Pierani A .Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nat Neurosci.* 2005;8:1002-12.
- Blackstad TW. Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. *J Comp Neurol.*1956; 105:417-537.
- Blackstad TW. On the termination of some afferents to the hippocampus and fascia dentata; an experimental study in the rat. *Acta Anat (Basel).* 1958; 35:202-14.
- Boccara CN, Sargolini F, Thoresen VH, Solstad T, Witter MP, Moser EI, Moser MB. Grid cells in pre- and parasubiculum. *Nat Neurosci.* 2010;13:987-94.
- Borrell V, Marín O. Meninges control tangential migration of hem-derived Cajal-Retzius cells via CXCL12/CXCR4 signaling. *Nat Neurosci.* 2006; 9:1284-93.
- Bostock E, Muller RU, Kubie JL. Experience-dependent modifications of hippocampal place cell firing. *Hippocampus.* 1991;1:193-205
- Brown JW. The development of the hippocampal formation in some insectivorous bats. *Int Symp on Phylogenesis and ontogenesis of the forebrain.* Georg Thieme. Stuttgart, 1922; pp: 92-103.
- Brun VH, Otnass MK, Molden S, Steffenach HA, Witter MP, Moser MB, Moser EI. Place cells and place recognition maintained by direct entorhinal-hippocampal circuitry. *Science.* 2002; 296(5576): 2243-6.
- Brunne B, Franco S, Bouché E, Herz J, Howell BW, Pahle J, Müller U, May P, Frotscher M, Bock HH. Role of the postnatal radial glial scaffold for the development of the dentate gyrus as revealed by Reelin signaling mutant mice. *Glia.* 2013 ;61:1347-63
- Brunne B, Zhao S, Derouiche A, Herz J, May P, Frotscher M, Bock HH. Origin, maturation, and astroglial transformation of secondary radial glial cells in the developing dentate gyrus. *Glia.* 2010;58:1553-69
- Burke MW, Palmour RM, Ervin FR, Ptito M. Neuronal reduction in frontal cortex of primates after prenatal alcohol exposure. *Neuroreport.* 2009; 20:13-7.
- Burwell RD The parahippocampal region: corticocortical connectivity. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;911:25-42

- Cabrera-Socorro A, Pueyo Morlans M, Suarez Sola ML, Gonzalez Delgado FJ, Castañeyra-Perdomo A, Marin MC, Meyer G. Multiple isoforms of the tumor protein p73 are expressed in the adult human telencephalon and choroid plexus and present in the cerebrospinal fluid. *Eur J Neurosci.* 2006; 23:2109-18
- Carmichael ST, Price JL. Limbic connections of the orbital and medial prefrontal cortex in macaque monkeys. *J Comp Neurol.* 1995; 363:615-641.
- Cenquizca LA, Swanson LW. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Res Rev.* 2007;56:1-26.
- Chambers RA, Sentir AM, Engleman EA. Ventral and dorsal striatal dopamine efflux and behavior in rats with simple vs. co-morbid histories of cocaine sensitization and neonatal ventral hippocampal lesions. *Psychopharmacology (Berl).* 2010 ; 212:73-83.
- Chan WY, Xia CL, Dong DC, Heizmann CW, Yew DT. Differential expression of S100 proteins in the developing human hippocampus and temporal cortex. *Microsc Res Tech.* 2003; 60:600-13.
- Chen L. Characterizing the Hippocampal Dentate Gyrus during Recent and Remote Trace Eyeblink Conditioning NURJ 1998
- Chevalleyre V, Siegelbaum SA. Strong CA2 pyramidal neuron synapses define a powerful disinaptic cortico-hippocampal loop. *Neuron.* 2010;66:560-72.
- Choi JS, Lee JH, Kim HY, Chun MH, Chung JW, Lee MY. Developmental expression of Bis protein in the cerebral cortex and hippocampus of rats. *Brain Res.* 2006 ; 1092: 69-78.
- Christie BR, Cameron HA. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Hippocampus.* 2006; 16:199-207.
- Chronister RB, DeFrance JF. Organization of projection neurons of the hippocampus. *Exp Neurol.* 1979; 66:509-23.
- Chronister RB, White LE. Fiberarchitecture of the Hippocampal formation: anatomy, projections, and structural significance. En RL Isaacson & KH Pribram (eds) "The hippocampus" (vol I: Structure and Development). Plenum Press. New York, London, 1975; pp:9-39.
- Cipriani S, Nardelli J, Verney C, Delezoide AL, Guimiot F, Gressens P, Adle-Biassette H. Dynamic Expression Patterns of Progenitor and Pyramidal Neuron Layer Markers in the Developing Human Hippocampus. *Cereb Cortex.* 2015 Apr 16. pii: bhv079.
- Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 1986 ;246:435-58
- Colgin LL, Moser EI, Moser MB Understanding memory through hippocampal remapping. *Trends Neurosci.* 2008;31:469-77.

Corkin S. Lasting consequences of bilateral medial temporal lobectomy: Clinical course and experimental findings in H.M. *Seminars in Neurology* 1984; 4: 249–259..

Coulon M, Wellman CL, Marjara IS, Janczak AM, Zanella AJ. Early adverse experience alters dendritic spine density and gene expression in prefrontal cortex and hippocampus in lambs. *Psychoneuroendocrinology*. 2013; 38:1112-21.

Crespo D, Stanfield BB, Cowan WM. Evidence that late-generated granule cells do not simply replace earlier formed neurons in the rat dentate gyrus. *Exp Brain Res*. 1986; 62:541-8.

D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T. A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant *reeler*. *Nature*. 1995; 374:719-23.

De Bergeyck V, Naerhuyzen B, Goffinet AM, Lambert de Rouvroit C. A panel of monoclonal antibodies against *reelin*, the extracellular matrix protein defective in *reeler* mutant mice. *J Neurosci Methods*. 1998 ; 82:17-24.

De Garengéot RC. *Splanchnologie, ou l'anatomie des viscères*. Tome II. Paris: Ed. Charles Osmont; 1742 (primera edición 1728).

Deguchi Y, Donato F, Galimberti I, Cabuy E, Caroni P. Temporally matched subpopulations of selectively interconnected principal neurons in the hippocampus. *Nat Neurosci*. 2011;14:495-504.

Del Río JA, Martínez A, Fonseca M, Auladell C, Soriano E. Glutamate-like immunoreactivity and fate of Cajal-Retzius cells in the murine cortex as identified with calretinin antibody. *Cereb Cortex*. 1995; 5:13-21.

Del Río JA, Heimrich B, Borrell V, Förster E, Drakew A, Alcántara S, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Derer P, Frotscher M, Soriano E. A role for Cajal-Retzius cells and *reelin* in the development of hippocampal connections. *Nature*. 1997; 385:70-4.

Demeter S, Rosene DL, Van Hoesen GW. Interhemispheric pathways of the hippocampal formation, presubiculum, and entorhinal and posterior parahippocampal cortices in the rhesus monkey: the structure and organization of the hippocampal commissures. *J Comp Neurol*. 1985; 233:30-47.

Diemerbrock Y. *Anatome corporis humani: plurimis novis inventis intructa*, 1672 Leiden.

Ding SL, Van Hoesen G, Rockland KS. Inferior parietal lobule projections to the presubiculum and neighboring ventromedial temporal cortical areas. *J Comp Neurol*. 2000; 425:510-30.

Ding SL. Comparative anatomy of the prosubiculum, subiculum, presubiculum, postsubiculum, and parasubiculum in human, monkey, and rodent. *J Comp Neurol*. 2013; 521:4145-62.

Ding SL, Van Hoesen GW. Borders, extent, and topography of human perirhinal cortex as revealed using multiple modern neuroanatomical and pathological markers. *Hum Brain Mapp.* 2010; 31:1359-79.

Ding SL, Van Hoesen GW. Organization and detailed parcellation of human hippocampal head and body regions based on a combined analysis of Cyto- and chemoarchitecture. *J Comp Neurol.* 2015;523:2233-53.

Dong HW, Swanson LW (a). Projections from bed nuclei of the stria terminalis, anteromedial area: cerebral hemisphere integration of neuroendocrine, autonomic, and behavioral aspects of energy balance. *J Comp Neurol.* 2006;494:142-78.

Dong HW, Swanson LW (b)..Projections from bed nuclei of the stria terminalis, magnocellular nucleus: implications for cerebral hemisphere regulation of micturition, defecation, and penile erection. *J Comp Neurol.* 2006 ;494:108-41.

Dong HW, Swanson LW (c). Projections from bed nuclei of the stria terminalis, dorsomedial nucleus: implications for cerebral hemisphere integration of neuroendocrine, autonomic, and drinking responses. *J Comp Neurol.* 2006;494:75-107

Dossani RH, Missios S, Nanda A. The legacy of Henry Molaison (1926-2008) and the impact of his bilateral mesial temporal lobe surgery on the study of human memory. *World Neurosurg.* 2015 Apr 22. pii: S1878-8750(15)00433-7.

Dougherty KA, Nicholson DA, Diaz L, Buss EW, Neuman KM, Chetkovich DM, Johnston D. Differential expression of HCN subunits alters voltage-dependent gating of h-channels in CA1 pyramidal neurons from dorsal and ventral hippocampus. *J Neurophysiol.* 2013;109:1940-53

Drakew A, Deller T, Heimrich B, Gebhardt C, Del Turco D, Tielsch A, Förster E, Herz J, Frotscher M. Dentate granule cells in reeler mutants and VLDLR and ApoER2 knockout mice. *Exp Neurol.* 2002;176:12-24.

Duvernoy HM. *The human Brain.* 2012 Springer. Wien-New York

Eckenhoff MF, Rakic P. Radial organization of the hippocampal dentate gyrus: a Golgi, ultrastructural, and immunocytochemical analysis in the developing rhesus monkey. *J Comp Neurol.* 1984; 223:1-21.

Eichenbaum H. A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat Rev Neurosci.* 2000;1:41-50.

Eichenbaum H. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron.* 2004; 44:109-20.

Eisch AJ, Mandyam CD. Adult neurogenesis: can analysis of cell cycle proteins move us "Beyond BrdU"? *Curr Pharm Biotechnol.* 2007;8:147-65

Ekstrom AD, Kahana MJ, Caplan JB, Fields TA, Isham EA, Newman EL, Fried I. Cellular networks underlying human spatial navigation. *Nature.* 2003 ;425:184-8.

Ekstrom AD, Arnold AE, Iaria G. A critical review of the allocentric spatial representation and its neural underpinnings: toward a network-based perspective. *Front Hum Neurosci.* 2014; 8:803.

Erdem A, Yaşargil G, Roth P. Microsurgical anatomy of the hippocampal arteries. *J Neurosurg.* 1993; 79:256-65.

Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 1998; 4:1313-7.

Falkai P, Bogerts B, Rozumek M. Limbic pathology in schizophrenia: the entorhinal region--a morphometric study. *Biol Psychiatry.* 1988; 24:515-21.

Fanselow MS, Dong HW. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron.* 2010; 65:7-19.

Förster E, Tielsch A, Saum B, Weiss KH, Johanssen C, Graus-Porta D, Müller U, Frotscher M. Reelin, Disabled 1, and beta 1 integrins are required for the formation of the radial glial scaffold in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99:13178-83.

Frotscher M. Dual role of Cajal-Retzius cells and reelin in cortical development. *Cell Tissue Res.* 1997; 290:315-22.

Frotscher M, Haas CA, Förster E. Reelin controls granule cell migration in the dentate gyrus by acting on the radial glial scaffold. *Cereb Cortex.* 2003; 13:634-40.

Fujise N, Hunziker W, Heizmann CW, Kosaka T. Distribution of the calcium binding proteins, calbindin D-28K and parvalbumin, in the subicular complex of the adult mouse. *Neurosci Res.* 1995; 22(1):89-107.

Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science.* 2000; 287:1433-8.

Gage FH. Molecular and cellular mechanisms contributing to the regulation, proliferation and differentiation of neural stem cells in the adult dentate gyrus. *Keio J Med.* 2010; 59:79-83

Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn HG, Fisher LJ, Suhonen JO, Peterson DA, Suhr ST, Ray J. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92:11879-83.

Ganser S. Über die vordere Hirncommissur der Säugethiere. *Arch Psychiatr Nervenkr* 1879; 9: 286-299.

Ganser S. Vergleichend-anatomische Studien über das Gehirn des Maulwurfs. *Morphol Jahrb.* 1882; 7:591-725

Gao Z, Ure K, Ables JL, Lagace DC, Nave KA, Goebbels S, Eisch AJ, Hsieh J. Neurod1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons. *Nat Neurosci.* 2009; 12:1090-2.

Gastaut, H., Lammers, H.J. Anatomie Du Rhinencéphale. Vol. 1. Editorial: Masson. Paris, 1961.

Gebhardt C, Del Turco D, Drakew A, Tielsch A, Herz J, Frotscher M, Deller T. Abnormal positioning of granule cells alters afferent fiber distribution in the mouse fascia dentata: morphologic evidence from reeler, apolipoprotein E receptor 2-, and very low density lipoprotein receptor knockout mice. *J Comp Neurol*. 2002; 445:278-92.

Giannaccini G, Betti L, Pirone A, Palego L, Fabiani O, Fabbrini L, Mascia G, Giusti L, Macchia M, Giusiani M, Martini C, Lucacchini A. Short-term effects of 3, 4-methylenedioxy-metamphetamine (MDMA) on 5-HT (1A) receptors in the rat hippocampus. *Neurochem Int*. 2007; 51:496-506.

Giedd JN, Snell JW, Lange N, Rajapakse JC, Casey BJ, Kozuch PL, Vaituzis AC, Vauss YC, Hamburger SD, Kaysen D, Rapoport JL. Quantitative magnetic resonance imaging of human brain development: ages 4-18. *Cereb Cortex*. 1996; 6: 551-60.

Gil V, Nocentini S, Del Río JA. Historical first descriptions of Cajal-Retzius cells: from pioneer studies to current knowledge. *Front Neuroanat*. 2014 May 27;8:32. doi: 10.3389/fnana.2014.00032. eCollection 2014

Giocomo LM, Zilli EA, Fransén E, Hasselmo ME. Temporal frequency of subthreshold oscillations scales with entorhinal grid cell field spacing. *Science*. 2007 ;315(5819): 1719-22

Godina G, Barasa A. Morphogenesis and histogenesis of the horn of ammon. *Z Zellforsch Mikrosk. Anat*. 1964; 63:327-55.

Gogtay N. Cortical brain development in schizophrenia: insights from neuroimaging studies in childhood-onset schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2008; 34:30-6.

Gogtay N, Nugent TF 3rd, Herman DH, Ordonez A, Greenstein D, Hayashi KM, Clasen L, Toga AW, Giedd JN, Rapoport JL, Thompson PM. Dynamic mapping of normal human hippocampal development. *Hippocampus*. 2006;16:664-72.

Goldman-Rakic PS, Selemon LD, Schwartz ML. Dual pathways connecting the dorsolateral prefrontal cortex with the hippocampal formation and parahippocampal cortex in the rhesus monkey. *Neuroscience*. 1984;12:719-43.

González-Gómez M, Meyer G. Dynamic expression of calretinin in embryonic and early fetal human cortex. *Front Neuroanat*. 2014 Jun 3;8:41. doi: 10.3389/fnana.2014.00041. eCollection 2014

Grove EA, Tole S. Patterning events and specification signals in the developing hippocampus. *Cereb Cortex*. 1999;9:551-61.

Grove EA, Tole S, Limon J, Yip L, Ragsdale CW. The hem of the embryonic cerebral cortex is defined by the expression of multiple Wnt genes and is compromised in Gli3-deficient mice. *Development*. 1998; 125:2315-25.

Guyon A, Nahon JL. Multiple actions of the chemokine stromal cell-derived factor- α on neuronal activity. *J Mol Endocrinol*. 2007; 38:365-76.

Haas CA, Dudeck O, Kirsch M, Huszka C, Kann G, Pollak S, Zentner J, Frotscher M. Role for reelin in the development of granule cell dispersion in temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*. 2002; 22:5797-802.

Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser MB, Moser EI. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*. 2005;436(7052):801-6

Haglund L, Swanson LW, Köhler C. The projection of the supramammillary nucleus to the hippocampal formation: an immunohistochemical and anterograde transport study with the lectin PHA-L in the rat. *J Comp Neurol*. 1984; 229:171-85.

Harding AJ, Halliday GM, Kril JJ. Variation in hippocampal neuron number with age and brain volume. *Cereb Cortex*. 1998;8:710-8.

Hartmann D, Sievers J, Pehlemann FW, Berry M. Destruction of meningeal cells over the medial cerebral hemisphere of newborn hamsters prevents the formation of the infrapyramidal blade of the dentate gyrus. *J Comp Neurol*. 1992; 320:33-61.

Heiman M. Über Gefäßstudien am aufgehellten Gehirn. I. Die Gefäße des Ammonhorns. *Arch Neurol Neurochir Psychiatr* 1937/38; 40:277-301.

Herkenham M. The connections of the nucleus reuniens thalami: evidence for a direct thalamo-hippocampal pathway in the rat. *J Comp Neurol*. 1978 ;177:589-610.

Hevner RF, Kinney HC. Reciprocal entorhinal-hippocampal connections established by human fetal midgestation. *J Comp Neurol*. 1996;372:384-94.

Hevner RF, Shi L, Justice N, Hsueh Y, Sheng M, Smiga S, Bulfone A, Goffinet AM, Campagnoni AT, Rubenstein JL. Tbr1 regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron*. 2001;29:353-66.

Hevner RF, Neogi T, Englund C, Daza RA, Fink A. Cajal-Retzius cells in the mouse: transcription factors, neurotransmitters, and birthdays suggest a pallial origin. *Brain Res Dev Brain Res*. 2003;141:39-53.

Hines M. Studies in the growth and differentiation of the telencephalon in man. The fissure hippocampi. *J Comp Neurol*. 1922; 34:73-171.

Hjorth-Simonsen A, Jeune B. Origin and termination of the hippocampal perforant path in the rat studied by silver impregnation. *J Comp Neurol*. 1972;144:215-32.

Hochstetter F . Beiträge zur Entwicklungsgeschichte des menschlichen Gehirn. I Teil. 1919. Deutle, Viena.

Hodge RD, Garcia AJ 3rd, Elsen GE, Nelson BR, Mussar KE, Reiner SL, Ramirez JM, Hevner RF. Tbr2 expression in Cajal-Retzius cells and intermediate neuronal

progenitors is required for morphogenesis of the dentate gyrus. *J Neurosci.* 2013; 33:4165-80.

Hollway FA, Bird DC, McLean GA, Devenport J, Holloway JA, Tapp WN. Effects of cortical, hypothalamic, and hippocampal lesions on chronic alcohol intake and preference in rats. *Curr Alcohol.* 1979;7:123-30.

Houser CR. Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain Res.* 1990;535:195-204.

Humphrey T. Correlations between the development of the hippocampal formation and the differentiation of the olfactory bulbs. *Ala J Med Sci.* 1966;3:235-69.

Humphrey T. Some observations on the development of the human hippocampal formation. *Trans Am Neurol Assoc.* 1964;89:207-9.

Humphrey T. The development of the human hippocampal fissure. *J Anat.* 1967;101:655-76.

Hunsaker MR¹, Scott JA, Bauman MD, Schumann CM, Amaral DG. Postnatal development of the hippocampus in the Rhesus macaque (*Macaca mulatta*): a longitudinal magnetic resonance imaging study. *Hippocampus.* 2014; 24:794-807.

Huther G, Dörfel J, Van der Loos H, Jeanmonod D. Microanatomic and vascular aspects of the temporomesial region. *Neurosurgery.* 1998;4:1118-36.

Ichinohe N, Rockland KS. Zinc-enriched amygdalo- and hippocampo-cortical connections to the inferotemporal cortices in macaque monkey. *Neurosci Res.* 2005;53:57-68.

Igarashi KM, Lu L, Colgin LL, Moser MB, Moser EI. Coordination of entorhinal-hippocampal ensemble activity during associative learning. *Nature.* 2014 ; 510(7503): 143-7

Igarashi KM, Ito HT, Moser EI, Moser MB. Functional diversity along the transverse axis of hippocampal area CA1. *FEBS Lett.* 2014 Aug 1;588(15):2470-6.

Iniesta I. Sobre el origen del asta de Amón. *Neurología.* 2014; 29:490-496.

Insausti R, Amaral DG. Hippocampal formation. In: Mai JK, Paxinos G, editors. *Atlas of the Human Brain.* Third Edition. London: Elsevier Academic Press; 2012. pp. 896–942

Insausti R, Amaral DG. Entorhinal cortex of the monkey: IV. Topographical and laminar organization of cortical afferents. *J Comp Neurol.* 2008; 509:608-41.

Insausti R, Annese J, Amaral DG, Squire LR. Human amnesia and the medial temporal lobe illuminated by neuropsychological and neurohistological findings for patient E.P. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:E1953-62

Insausti R, Cebada-Sánchez S, Marcos P. Postnatal development of the human hippocampal formation. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2010; 206:1-86.

Jagasia R, Steib K, Englberger E, Herold S, Faus-Kessler T, Saxe M, Gage FH, Song H, Lie DC. GABA-cAMP response element-binding protein signaling regulates maturation and survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci.* 2009; 29:7966-77.

Jašarević E, Hecht PM, Fritsche KL, Beversdorf DQ, Geary DC. Dissociable effects of dorsal and ventral hippocampal DHA content on spatial learning and anxiety-like behavior. *Neurobiol Learn Mem.* 2014; 116:59-68

Jessberger S, Gage FH. Adult neurogenesis: bridging the gap between mice and humans. *Trends Cell Biol.* 2014; 24:558-63.

Jones, Edward G., Peters, Alan (Eds.). *Cerebral Cortex Further Aspects of Cortical Function, Including Hippocampus.* Springer, New York. Heidelberg, 2007.

Jones MW, McHugh TJ. Updating hippocampal representations: CA2 joins the circuit. *Trends Neurosci.* 2011; 34:526-35

Jung MW, Wiener SI, McNaughton BL. Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. *J Neurosci.* 1994 ; 14:7347-56

Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell.* 1997; 90:809-19.

Kaplan MS, Hinds JW. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science.* 1977; 197:1092-4.

Karalay O, Doberauer K, Vadodaria KC, Knobloch M, Berti L, Miquelajauregui A, Schwark M, Jagasia R, Taketo MM, Tarabykin V, Lie DC, Jessberger S. Prospero-related homeobox 1 gene (Prox1) is regulated by canonical Wnt signaling and has a stage-specific role in adult hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108:5807-12.

Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz JM. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods.* 2002; 115:97-105.

Kelava I, Lewitus E, Huttner WB. The secondary loss of gyrencephaly as an example of evolutionary phenotypical reversal. *Front Neuroanat.* 2013 Jun 26; 7:16. doi: 10.3389/fnana.2013.00016. eCollection 2013.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94:10409-14.

- Khazipov R, Esclapez M, Caillard O, Bernard C, Khalilov I, Tyzio R, Hirsch J, Dzhala V, Berger B, Ben-Ari Y. Early development of neuronal activity in the primate hippocampus in utero. *J Neurosci*. 2001;21:9770-81
- Kier EL, Kim JH, Fulbright RK, Bronen RA. Embryology of the human fetal hippocampus: MR imaging, anatomy, and histology. *Am J Neuroradiol*. 1997;18:525-32
- Kim EJ, Ables JL, Dickel LK, Eisch AJ, Johnson JE. Ascl1 (Mash1) defines cells with long-term neurogenic potential in subgranular and subventricular zones in adult mouse brain. *PLoS One*. 2011;6:e18472..
- Kitamura T, Inokuchi K. Role of adult neurogenesis in hippocampal-cortical memory consolidation. *Mol Brain*. 2014 ;7:13.
- Kloosterman F, van Haeften T, Lopes da Silva FH. Two reentrant pathways in the hippocampal-entorhinal system. *Hippocampus*. 2004;14:1026-39
- Kloosterman F, Van Haeften T, Witter MP, Lopes Da Silva FH. Electrophysiological characterization of interlaminar entorhinal connections: an essential link for re-entrance in the hippocampal-entorhinal system. *Eur J Neurosci*. 2003;18:3037-52
- Knobloch M, Braun SM, Zurkirchen L, von Schoultz C, Zamboni N, Araújo-Bravo MJ, Kovacs WJ, Karalay O, Suter U, Machado RA, Roccio M, Lutolf MP, Semenkovich CF, Jessberger S. Metabolic control of adult neural stem cell activity by Fasn-dependent lipogenesis. *Nature*. 2013; 493:226-30.
- Knoth R, Singec I, Ditter M, Pantazis G, Capetian P, Meyer RP, Horvat V, Volk B, Kempermann G. Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS One*. 2010; 5:e8809.
- Kornack DR, Rakic P. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:5768-73.
- Kosel KC, Van Hoesen GW, Rosene DL. A direct projection from the perirhinal cortex (area 35) to the subiculum in the rat. *Brain Res*. 1983 ;269:347-51.
- Kostović I, Judaš M, Sedmak G. Developmental history of the subplate zone, subplate neurons and interstitial white matter neurons: relevance for schizophrenia. *Int J Dev Neurosci*. 2011; 29:193-205.
- Kostović I, Lukinović N, Judas M, Bogdanović N, Mrzljak L, Zecević N, Kubat M. Structural basis of the developmental plasticity in the human cerebral cortex: the role of the transient subplate zone. *Metab Brain Dis*. 1989; 4:17-2.
- Krayniak PF, Siegel A, Meibach RC, Fruchtmann D, Scrimenti M. Origin of the fornix system in the squirrel monkey. *Brain Res*. 1979;160:401-11.

Krettek JE, Price JL. Projections from the amygdaloid complex and adjacent olfactory structures to the entorhinal cortex and to the subiculum in the rat and cat. *J Comp Neurol*. 1977;172:723-52.

Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci*. 1996;16:2027-33.

Laird PW, Zijderveld A, Linders K, Rudnicki MA, Jaenisch R, Berns A. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res*. 1991; 19:4293.

Lambert de Rouvroit C, Goffinet AM. The reeler mouse as a model of brain development. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 1998;150:1-106.

Lammers HJ. The normal connections of the amygdaloid complex in mammals. En "The Neurobiology of the amygdale. BF Eleftheriou (ed). Plenum Press, New York, 1972, pp:123-144.

Laplagne DA, Espósito MS, Piatti VC, Morgenstern NA, Zhao C, van Praag H, Gage FH, Schinder AF. Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS Biol*. 2006 Nov;4(12):e409

Laplagne DA, Kamienkowski JE, Espósito MS, Piatti VC, Zhao C, Gage FH, Schinder AF. Similar GABAergic inputs in dentate granule cells born during embryonic and adult neurogenesis. *Eur J Neurosci*. 2007;25:2973-81

Larriva-Sahd J. Some contributions of Rafael Lorente de Nó to neuroscience: a reminiscence. *Brain Res Bull*. 2002;59:1-11.

Lavenex P, Banta Lavenex P, Amaral DG. Postnatal development of the primate hippocampal formation. *Dev Neurosci*. 2007; 29:179-92.

Leichnetz GR, Astruc J. Preliminary evidence for a direct projection of the prefrontal cortex to the hippocampus in the squirrel monkey. *Brain Behav Evol*. 1975;11:355-64.

Lengyel M, Szatmáry Z, Erdi P. Dynamically detuned oscillations account for the coupled rate and temporal code of place cell firing. *Hippocampus*. 2003;13(6):700-14

Leutgeb S, Leutgeb JK, Barnes CA, Moser EI, McNaughton BL, Moser MB. Independent codes for spatial and episodic memory in hippocampal neuronal ensembles. *Science*. 2005;309(5734):619-23

Li M, Ransohoff RM. Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: a migration from immunology to neurobiology. *Prog Neurobiol*. 2008;84:116-31.

Li XJ, Zhang X, Johnson MA, Wang ZB, Lavaute T, Zhang SC. Coordination of sonic hedgehog and Wnt signaling determines ventral and dorsal telencephalic neuron types from human embryonic stem cells. *Development*. 2009;136:4055-63.

- Lim C, Blume HW, Madsen JR, Saper CB. Connections of the hippocampal formation in humans: I. The mossy fiber pathway. *J Comp Neurol.* 1997;385:325-51.
- Lim C, Mufson EJ, Kordower JH, Blume HW, Madsen JR, Saper CB. Connections of the hippocampal formation in humans: II. The endfolial fiber pathway. *J Comp Neurol.* 1997;385:352-71.
- López-Bendito G¹, Sánchez-Alcañiz JA, Pla R, Borrell V, Picó E, Valdeolmillos M, Marín O. Chemokine signaling controls intracortical migration and final distribution of GABAergic interneurons. *J Neurosci.* 2008; 28:1613-24.
- Lorente de Nó. Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study on the ammonic system. *J Psychol Neurol, Leipzig* 1934; 46: 113-177.
- Lowe A, Dalton M, Sidhu K, Sachdev P, Reynolds B, Valenzuela M. Neurogenesis and precursor cell differences in the dorsal and ventral adult canine hippocampus. *Neurosci Lett.* 2015;593:107-13.
- Lu M, Grove EA, Miller RJ. Abnormal development of the hippocampal dentate gyrus in mice lacking the CXCR4 chemokine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:7090-5.
- Lum JA, Conti-Ramsden G, Page D, Ullman MT. Working, declarative and procedural memory in specific language impairment. *Cortex.* 2012 ;48:1138-54.
- Luque JM, Morante-Oria J, Fairén A. Localization of ApoER2, VLDLR and Dab1 in radial glia: groundwork for a new model of reelin action during cortical development. *Brain Res Dev Brain Res.* 2003 ;140:195-203.
- Lynch G, Cotman CW. The hippocampus as a model for studying anatomical plasticity in the adult brain. En RL Isaacson & KH Pribram (eds) "The hippocampus" (vol I: Structure and Development). Plenum Press. New York, London, 1975, pp:123-154.
- Macchi G. The ontogenic development of the telencephalon in man. *J Comp Neurol* 1951; 95:245-305.
- Machold R, Hayashi S, Rutlin M, Muzumdar MD, Nery S, Corbin JG, Gritli-Linde A, Dellovade T, Porter JA, Rubin LL, Dudek H, McMahon AP, Fishell G. Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron.* 2003;39:937-50.
- Manns JR, Eichenbaum H. Evolution of declarative memory. *Hippocampus.* 2006; 16: 795-808
- Maren S, Holt WG. Hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats: muscimol infusions into the ventral, but not dorsal, hippocampus impair the acquisition of conditional freezing to an auditory conditional stimulus. *Behav Neurosci.* 2004 ;118:97-110

Marín-Burgin A, Mongiat LA, Pardi MB, Schinder AF Unique processing during a period of high excitation/inhibition balance in adult-born neurons. *Science*. 2012; 335:1238-42.

Marinkovic I, Lyytinen J, Valanne L, Niinikuru R, Pekkonen E. Bilateral hippocampal infarction as etiology of sudden and prolonged memory loss. *Case Rep Neurol*. 2012 ;4:207-11.

Markus EJ, Qin YL, Leonard B, Skaggs WE, McNaughton BL, Barnes CA. Interactions between location and task affect the spatial and directional firing of hippocampal neurons. *J Neurosci*. 1995;15:7079-94.

Mathern GW, Babb TL, Leite JP, Pretorius K, Yeoman KM, Kuhlman PA. The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. *Epilepsy Res*. 1996 ;26:151-61.

Mattson MP. Superior pattern processing is the essence of the evolved human brain. *Front Neurosci*. 2014;8:265.

McHugh TL, Saykin AJ, Wishart HA, Flashman LA, Cleavinger HB, Rabin LA, Mamourian AC, Shen L. Hippocampal volume and shape analysis in an older adult population. *Clin Neuropsychol*. 2007;21:130-45

Medina L, Abellán A, Desfilis E. A never-ending search for the evolutionary origin of the neocortex: rethinking the homology concept. *Brain Behav Evol*. 2013;81:150-3

Medina-Bolívar C, González-Arnay E, Talos F, González-Gómez M, Moll UM, Meyer G. Cortical hypoplasia and ventriculomegaly of p73-deficient mice: Developmental and adult analysis. *J Comp Neurol*. 2014 ;52 :2663-79.

Meibach RC, Siegel A. Subicular projections to the posterior cingulate cortex in rats. *Exp Neurol*. 1977; 57:264-74.

Meibach RC, Siegel A. Thalamic projections of the hippocampal formation: evidence for an alternate pathway involving the internal capsule. *Brain Res*. 1977;134:1-12.

Meibach RC, Siegel A. Efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *Brain Res*. 1977;124:197-224.

Meibach RC, Siegel A. Efferent connections of the septal area in the rat: an analysis utilizing retrograde and anterograde transport methods. *Brain Res*. 1977 ;119:1-20.

Meyer G. Genetic control of neuronal migrations in human cortical development. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2007;189:1 p preceding 1, 1-111.

Meyer G, Perez-Garcia CG, Abraham H, Caput D. Expression of p73 and Reelin in the developing human cortex. *J Neurosci*. 2002; 22:4973-86.

Meyer G, Cabrera Socorro A, Perez Garcia CG, Martinez Millan L, Walker N, Caput D. Developmental roles of p73 in Cajal-Retzius cells and cortical patterning. *J Neurosci*. 2004 ;24:9878-87.

Meyer G. Building a human cortex: the evolutionary differentiation of Cajal-Retzius cells and the cortical hem. *J Anat*. 2010;217:334-43.

Meyer G, Schaaps JP, Moreau L, Goffinet AM. Embryonic and early fetal development of the human neocortex. *J Neurosci*. 2000;20:1858-68.

Meyer G, González-Hernández T. Developmental changes in layer I of the human neocortex during prenatal life: a DiI-tracing and AChE and NADPH-d histochemistry study. *J Comp Neurol*. 1993;338:317-36.

Meyer G, De Rouvroit CL, Goffinet AM, Wahle P. Disabled-1 mRNA and protein expression in developing human cortex. *Eur J Neurosci*. 2003;17:517-25.

Miller, GA, Galanter, E., & Pribram, KA. Plans and the structure of behavior. New York: Holt, Rhinehart, & Winston, 1960.

Milner PM . A cell assembly the theory of hippocampal amnesia. *Neuropsychologia*, 1989; 6: 215 -234.

Mira H, Andreu Z, Suh H, Lie DC, Jessberger S, Consiglio A, San Emeterio J, Hortigüela R, Marqués-Torrejón MA, Nakashima K, Colak D, Götz M, Fariñas I, Gage FH. Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*. 2010 ;7:78-89.

Mohedano-Moriano A, Martinez-Marcos A, Pro-Sistiaga P, Blaizot X, Arroyo-Jimenez MM, Marcos P, Artacho-Pérula E, Insausti R. Convergence of unimodal and polymodal sensory input to the entorhinal cortex in the fascicularis monkey. *Neuroscience*. 2008;151:255-71.

Moser EI, Kropff E, Moser MB Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annu Rev Neurosci*. 2008;31:69-89.

Moser EI, Moser MB. Grid cells and neural coding in high-end cortices. *Neuron*. 2013; 80: 765-74.

Moser E, Moser MB. Mapping your every move. *Cerebrum*. 2014 Mar 1;2014:4. eCollection 2014 Mar.

Muller RU, Kubie JL, Ranck JB Jr. Spatial firing patterns of hippocampal complex-spike cells in a fixed environment. *J Neurosci*. 1987;7:1935-50

Muller RU, Stead M. Hippocampal place cells connected by Hebbian synapses can solve spatial problems. *Hippocampus*. 1996;6:709-19

Mouritzen-Dam A. The possible pathological importance of dysgenesis, heterotopia and other cellular displacements in the brain. *Epilepsy Res Suppl*. 1992;9:61-5.

- Nakazawa K, Quirk MC, Chitwood RA, Watanabe M, Yeckel MF, Sun LD, Kato A, Carr CA, Johnston D, Wilson MA, Tonegawa S. Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science*. 2002;297:211-8
- Novak K, Czech T, Prayer D, Dietrich W, Serles W, Lehr S, Baumgartner C. Individual variations in the sulcal anatomy of the basal temporal lobe and its relevance for epilepsy surgery: an anatomical study performed using magnetic resonance imaging. *J Neurosurg*. 2002;96:464-73.
- Nowakowski RS, Rakic P. The site of origin and route and rate of migration of neurons to the hippocampal region of the rhesus monkey. *J Comp Neurol*. 1981;196:129-54.
- Nowakowski RS, Rakic P. The mode of migration of neurons to the hippocampus: a Golgi and electron microscopic analysis in foetal rhesus monkey. *J Neurocytol*. 1979;8:697-718.
- O'Keefe J. Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp Neurol*. 1976; 51: 78-109.
- O'Keefe J, Burgess N. Dual phase and rate coding in hippocampal place cells: theoretical significance and relationship to entorhinal grid cells. *Hippocampus*. 2005;15:853-66
- O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res*. 1971;34:171-5.
- O'Keefe J, Recce ML. Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus*. 1993;3:317-30
- O'Leary M. A., Bloch J. I., Flynn J. J., Gaudin T. J., Giallombardo A., Giannini N. P., et al.). The placental mammal ancestor and the post-k-pg radiation of placentals. *Science* 2013; 339, 662–667
- Optiz J. *Potter's Pathology of the Fetus, Infant and Child*. 2007, Elsevier, Amsterdam
- O'Rahilly R, Müller F. Neurulation in the normal human embryo. *Ciba Found Symp*. 1994;181:70-82
- Ottersen OP. Connections of the amygdala of the rat. IV: Corticoamygdaloid and intraamygdaloid connections as studied with axonal transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol*. 1982;205:30-48.
- Ouchi Y, Banno Y, Shimizu Y, Ando S, Hasegawa H, Adachi K, Iwamoto T. Reduced adult hippocampal neurogenesis and working memory deficits in the Dgcr8-deficient mouse model of 22q11.2 deletion-associated schizophrenia can be rescued by IGF2. *J Neurosci*. 2013;33:9408-19.
- Overman WH. Performance on traditional matching to sample, non-matching to sample, and object discrimination tasks by 12- to 32-month-old children. A developmental progression. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;608:365-85.

Overman W, Bachevalier J, Turner M, Peuster A. Object recognition versus object discrimination: comparison between human infants and infant monkeys. *Behav Neurosci.* 1992 ;106:15-29.

Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol.* 2000;425:479-94.

Paredes MF, Li G, Berger O, Baraban SC, Pleasure SJ. Stromal-derived factor-1 (CXCL12) regulates laminar position of Cajal-Retzius cells in normal and dysplastic brains. *J Neurosci.* 2006 ;26:9404-12.

Parekh MB, Rutt BK, Purcell R, Chen Y, Zeineh MM. Ultra-high resolution in-vivo 7.0T structural imaging of the human hippocampus reveals the endfolial pathway. *Neuroimage.* 2015;112:1-6.

Payne L, Sekuler R. The importance of ignoring: Alpha oscillations protect selectivity. *Curr Dir Psychol Sci.* 2014;23:171-177.

Paxinos, G.; Franklin, KBJ. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.* 2. San Diego, CA: Academic; 2001

Pereira AC, Huddleston DE, Brickman AM, Sosunov AA, Hen R, McKhann GM, Sloan R, Gage FH, Brown TR, Small SA. An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 ;104:5638-43

Pikkarainen M, Rönkkö S, Savander V, Insausti R, Pitkänen A. Projections from the lateral, basal, and accessory basal nuclei of the amygdala to the hippocampal formation in rat. *J Comp Neurol.* 1999;403:229-60.

Pleasure SJ, Collins AE, Lowenstein DH. Unique expression patterns of cell fate molecules delineate sequential stages of dentate gyrus development. *J Neurosci.* 2000; 20:6095-105.

Pofantis H, Georgopoulos P, Petrides T, Papatheodoropoulos C. Differences in paired-pulse inhibition and facilitation in the dentate gyrus and CA3 field between dorsal and ventral rat hippocampus. *Brain Res.* 2015;1608:21-30.

Pothuizen HH, Zhang WN, Jongen-Rêlo AL, Feldon J, Yee BK. Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. *Eur J Neurosci.* 2004 ;19:705-12.

Powell EW, Hines G. Septohippocampal interface. En RL Isaacson & KH Pribram (eds) "The hippocampus" (vol I: Structure and Development). Plenum Press. New York, London, 1975; pp:41-59.

Pueyo Morlans M. Parcelación citoarquitectónica del prosencéfalo humano durante el desarrollo fetal. Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna, 2014.

Ramón y Cajal, S. Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés Maloine, Paris, France. 1909- 1911.

Rakic P, Yakovlev PI. Development of the corpus callosum and cavum septi in man. J Comp Neurol. 1968;132:45-72.

Rangel LM, Quinn LK, Chiba AA, Gage FH, Aimone JB. A hypothesis for temporal coding of young and mature granule cells. Front Neurosci. 2013;7:75. doi: 10.3389/fnins.2013.0007

Raudies F, Hasselmo ME. A model of hippocampal spiking responses to items during learning of a context-dependent task. Front Syst Neurosci. 2014;8:178.

Recinto P, Samant AR, Chavez G, Kim A, Yuan CJ, Soleiman M, Grant Y, Edwards S, Wee S, Koob GF, George O, Mandyam CD. Levels of neural progenitors in the hippocampus predict memory impairment and relapse to drug seeking as a function of excessive methamphetamine self-administration. Neuropsychopharmacology. 2012; 37:1275-87.

Rees G, Kreiman G, Koch C. Neural correlates of consciousness in humans. Nat Rev Neurosci. 2002;3:261-70

Reif A, Fritzen S, Finger M, Strobel A, Lauer M, Schmitt A, Lesch KP. Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. Mol Psychiatry. 2006;11:514-22.

Retzius G. Studien über Ependyme und Neuroglia. Biologische Untersuchungen. Neue Folge 1893; 5:9-26.

Rice DS, Curran T. Mutant mice with scrambled brains: understanding the signaling pathways that control cell positioning in the CNS. Genes Dev. 1999;13:2758-73

Rickmann M, Amaral DG, Cowan WM. Organization of radial glial cells during the development of the rat dentate gyrus. J Comp Neurol. 1987; 264:449-79.

Risold PY, Swanson LW. Structural evidence for functional domains in the rat hippocampus. Science 1996 ;272(5267):1484-6

Roberts AC, Tomic DL, Parkinson CH, Roeling TA, Cutter DJ, Robbins TW, Everitt BJ. Forebrain connectivity of the prefrontal cortex in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*): an anterograde and retrograde tract-tracing study. J Comp Neurol. 2007; 502 : 86-112

Rockland KS, Van Hoesen GW. Some temporal and parietal cortical connections converge in CA1 of the primate hippocampus. Cereb Cortex. 1999;9:232-7.

Rosene DL, Van Hoesen GW. Hippocampal efferents reach widespread areas of cerebral cortex and amygdala in the rhesus monkey. Science. 1977;198:315-7.

Rosene DL, Van Hoesen GW. The hippocampal formation of the primate brain, a review of some comparative aspects of cytoarchitecture and connections. En Jones EG, Peters A (eds). Cerebral cortex. Further aspects of cortical function including hippocampus. Plenum Press. New York, 1987, pp: 345-456

Roy A, Gonzalez-Gomez M, Pierani A, Meyer G, Tole S. Lhx2 regulates the development of the forebrain hem system. Cereb Cortex. 2014;24:1361-72.

Roy A, Jana M, Corbett GT, Ramaswamy S, Kordower JH, Gonzalez FJ, Pahan K. Regulation of cyclic AMP response element binding and hippocampal plasticity-related genes by peroxisome proliferator-activated receptor α . Cell Rep. 2013 ;4:724-37.

Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O'Carroll CM, Kheirbek MA, Burghardt NS, Fenton AA, Dranovsky A, Hen R. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. Nature. 2011 ;472:466-70.

Sargolini F, Fyhn M, Hafting T, McNaughton BL, Witter MP, Moser MB, Moser EI. Conjunctive representation of position, direction, and velocity in entorhinal cortex. Science. 2006;312(5774):758-62

Saunders RC, Rosene DL. A comparison of the efferents of the amygdala and the hippocampal formation in the rhesus monkey: I. Convergence in the entorhinal, prorrhinal, and perirhinal cortices. J Comp Neurol. 1988; 271:153-84.

Saunders RC, Rosene DL, Van Hoesen GW. Comparison of the efferents of the amygdala and the hippocampal formation in the rhesus monkey: II. Reciprocal and non-reciprocal connections. J Comp Neurol. 1988; 271:185-207.

Savelli F, Yoganarasimha D, Knierim JJ. Influence of boundary removal on the spatial representations of the medial entorhinal cortex. Hippocampus. 2008;18(12):1270-82.

Schmidt B, Hinman JR, Jacobson TK, Szkudlarek E, Argraves M, Escabí MA, Markus EJ. Dissociation between dorsal and ventral hippocampal theta oscillations during decision-making. J Neurosci. 2013 ;33(14):6212-24.

Schultz C, Engelhardt M. Anatomy of the hippocampal formation. Front Neurol Neurosci. 2014;34:6-17.

Schumann CM, Hamstra J, Goodlin-Jones BL, Kwon H, Reiss AL, Amaral DG. Hippocampal size positively correlates with verbal IQ in male children. Hippocampus. 2007;17:486-93.

Schwerdtfeger WK. Direct efferent and afferent connections of the hippocampus with the neocortex in the marmoset monkey. Am J Anat. 1979;156:77-82.

Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1957 ;20:11-21

Seress L, Abrahám H, Tornóczy T, Kosztolányi G. Cell formation in the human hippocampal formation from mid-gestation to the late postnatal period. *Neuroscience*. 2001;105:831-43.

Seress L, Gulyás AI, Ferrer I, Tunon T, Soriano E, Freund TF. Distribution, morphological features, and synaptic connections of parvalbumin- and calbindin D28k-immunoreactive neurons in the human hippocampal formation. *J Comp Neurol*. 1993 Nov 8;337(2):208-30.

Seress L, Gulyás AI, Freund TF. Pyramidal neurons are immunoreactive for calbindin D28k in the CA1 subfield of the human hippocampus. *Neurosci Lett*. 1992 Apr 27;138(2):257-60

Seress L, Ribak CE. Postnatal development of CA3 pyramidal neurons and their afferents in the Ammon's horn of rhesus monkeys. *Hippocampus*. 1995;5:217-31.

Seri B, García-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci*. 2001;21:7153-60.

Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, Vincent P, Pumiglia K, Temple S. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science*. 2004; 304:1338-40.

Sievers J, Hartmann D, Pehlemann FW, Berry M. Development of astroglial cells in the proliferative matrices, the granule cell layer, and the hippocampal fissure of the hamster dentate gyrus. *J Comp Neurol*. 1992;320:1-32

Song J, Zhong C, Bonaguidi MA, Sun GJ, Hsu D, Gu Y, Meletis K, Huang ZJ, Ge S, Enikolopov G, Deisseroth K, Luscher B, Christian KM, Ming GL, Song H. Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature*. 2012 ;489:150-4.

Soriano E, Del Río JA, Martínez A, Supèr H. Organization of the embryonic and early postnatal murine hippocampus. I. Immunocytochemical characterization of neuronal populations in the subplate and marginal zone. *J Comp Neurol*. 1994;342:571-95.

Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Huttner HB, Boström E, Westerlund I, Vial C, Buchholz BA, Possnert G, Mash DC, Druid H, Frisén J. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*. 2013 ;153:1219-27.

Squire LR, Stark CE, Clark RE. The medial temporal lobe. *Annu Rev Neurosci*. 2004;27:279-306.

Stanfield B, Cowan WM. Evidence for the sprouting of entorhinal afferents into the "hippocampal zone" of the molecular layer of the dentate gyrus. *Anat Embryol (Berl)*. 1979;156:37-52.

Stanfield BB, Cowan WM. The development of the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice. *J Comp Neurol*. 1979;185:423-59.

Stanfield BB, Trice JE. Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp Brain Res.* 1988;72(2):399-406

Steiner B, Klempin F, Wang L, Kott M, Kettenmann H, Kempermann G. Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia.* 2006 ;54:805-14.

Steiner B, Zurborg S, Hörster H, Fabel K, Kempermann G. Differential 24 h responsiveness of Prox1-expressing precursor cells in adult hippocampal neurogenesis to physical activity, environmental enrichment, and kainic acid-induced seizures. *Neuroscience.* 2008 ;154:521-9.

Stephan H. Allocortex. En "Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen (W. Bargmann, Ed.), Vol. 4, Part 9, Springer-Verlag, Berlin and New York. 1975, 998pp.

Steward O. Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol.* 1976;167:285-314

Stumm RK, Zhou C, Ara T, Lazarini F, Dubois-Dalcq M, Nagasawa T, Höllt V, Schulz S. CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex. *J Neurosci.* 2003;23:5123-30.

Suarez-Solá, ML Citoarquitectura y neuroquímica del hipocampo humano con proteínas ligantes de calcio en el proceso de envejecimiento. Tesis doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de La Laguna 1996

Subramanian L, Remedios R, Shetty A, Tole S. Signals from the edges: the cortical hem and antihem in telencephalic development. *Semin Cell Dev Biol.* 2009 ;20:712-8

Suh H, Consiglio A, Ray J, Sawai T, D'Amour KA, Gage FH. In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2⁺ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell.* 2007;1:515-28.

Supèr H, Martínez A, Soriano E. Degeneration of Cajal-Retzius cells in the developing cerebral cortex of the mouse after ablation of meningeal cells by 6 hydroxydopamine. *Brain Res Dev Brain Res.* 1997;98:15-20.

Suzuki M, Hagino H, Nohara S, Zhou SY, Kawasaki Y, Takahashi T, Matsui M, Seto H, Ono T, Kurachi M. Male-specific volume expansion of the human hippocampus during adolescence. *Cereb Cortex.* 2005 Feb;15(2):187-93.

Swanson LW. A direct projection from Ammon's horn to prefrontal cortex in the rat. *Brain Res.* 1981;217:150-4.

Swanson LW, Cowan WM. An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J Comp Neurol.* 1977;172:49-84.

Swanson LW, Cowan WM. Hippocampo-hypothalamic connections: origin in subicular cortex, not ammon's horn. *Science*. 1975; 189:303-4.

Swanson LW, Cowan WM. The efferent connections of the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus. *J Comp Neurol*. 1975; 160:1-12.

Swanson LW, Wyss JM, Cowan WM. An autoradiographic study of the organization of intrahippocampal association pathways in the rat. *J Comp Neurol*. 1978;181:681-715.

Tatu L, Vuillier F. Structure and vascularization of the human hippocampus. *Front Neurol Neurosci*. 2014;34:18-25.

Taube JS. The head direction signal: origins and sensory-motor integration. *Annu Rev Neurosci*. 2007;30:181-207.

Taube JS, Muller RU, Ranck JB Jr. Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. I. Description and quantitative analysis. *J Neurosci*. 1990;10:420-35

Testut L. *Tratado de Anatomía Humana*. Salvat, Barcelona, 1923.

Tiveron MC, Rossel M, Moepps B, Zhang YL, Seidenfaden R, Favor J, König N, Cremer H. Molecular interaction between projection neuron precursors and invading interneurons via stromal-derived factor 1 (CXCL12)/CXCR4 signaling in the cortical subventricular zone/intermediate zone. *J Neurosci*. 2006;26:13273-8.

Uchimura J. Über die Gefäßversorgung des Ammonhornes. *Z Neurol Psychiatr* 1928; 112:1-19.

Ullman MT. Contributions of memory circuits to language: the declarative/procedural model. *Cognition*. 2004 ;92:231-70.

Ullman MT. Is Broca's area part of a basal ganglia thalamocortical circuit? *Cortex*. 2006;42:480-5.

Vadodaria KC, Brakebusch C, Suter U, Jessberger S. Stage-specific functions of the small Rho GTPases Cdc42 and Rac1 for adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci*. 2013;33:1179-89.

Van Hoesen G, Pandya DN (a). Some connections of the entorhinal (area 28) and perirhinal (area 35) cortices of the rhesus monkey. I. Temporal lobe afferents. *Brain Res*. 1975;95:1-24.

Van Hoesen GW, Pandya DN (b). Some connections of the entorhinal (area 28) and perirhinal (area 35) cortices of the rhesus monkey. III. Efferent connections. *Brain Res*. 1975;95:39-59.

Van Hoesen G, Pandya DN, Butters N. Some connections of the entorhinal (area 28) and perirhinal (area 35) cortices of the rhesus monkey. II. Frontal lobe afferents. *Brain Res*. 1975;95:25-38.

Van Hoesen GW, Rosene DL, Mesulam MM. Subicular input from temporal cortex in the rhesus monkey. *Science*. 1979;205:608-10.

van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96: 13427-31.

van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*. 1999 ;2:266-70.

Vargha-Khadem F, Gadian DG, Watkins KE, Connelly A, Van Paesschen W, Mishkin M. Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory. *Science*. 1997 ;277:376-80.

Veazey RB, Amaral DG, Cowan WM. The morphology and connections of the posterior hypothalamus in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). I. Cytoarchitectonic organization. *J Comp Neurol*. 1982;207:114-34.

Veazey RB, Amaral DG, Cowan WM. The morphology and connections of the posterior hypothalamus in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). II. Efferent connections. *J Comp Neurol*. 1982;207:135-56.

Verney C, Derer P. Cajal-Retzius neurons in human cerebral cortex at midgestation show immunoreactivity for neurofilament and calcium-binding proteins. *J Comp Neurol*. 1995;359:144-53

Weiss KH, Johanssen C, Tielsch A, Herz J, Deller T, Frotscher M, Förster E. Malformation of the radial glial scaffold in the dentate gyrus of reeler mice, scrambler mice, and ApoER2/VLDLR-deficient mice. *J Comp Neurol*. 2003;460:56-65.

Wigle JT, Chowdhury K, Gruss P, Oliver G. Prox1 function is crucial for mouse lens-fibre elongation. *Nat Genet*. 1999 ;21:318-22.

Winston GP, Stretton J, Sidhu MK, Symms MR, Thompson PJ, Duncan JS. Structural correlates of impaired working memory in hippocampal sclerosis. *Epilepsia*. 2013;54:1143-53.

Witter MP, Amaral D.G.. Hippocampal Formation. In: Paxinos G, editor. *The Rat Nervous System*. 2004. : Elsevier. Amsterdam.

Witter MP, Griffioen AW, Jorritsma-Byham B, Krijnen JL. Entorhinal projections to the hippocampal CA1 region in the rat: an underestimated pathway. *Neurosci Lett*. 1988;85:193-8

Witter MP, Van Hoesen GW, Amaral DG. Topographical organization of the entorhinal projection to the dentate gyrus of the monkey. *J Neurosci*. 1989;9:216-28.

Wood ER, Dudchenko PA, Eichenbaum H. The global record of memory in hippocampal neuronal activity. *Nature*. 1999;397(6720):613-6

- Wood ER, Dudchenko PA, Robitsek RJ, Eichenbaum H Hippocampal neurons encode information about different types of memory episodes occurring in the same location. *Neuron*. 2000;27:623-33
- Yan XX, Ribak CE. Prenatal development of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase activity in the human hippocampal formation. *Hippocampus*. 1997;7:215-31.
- Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J, Vagner C, Bonnet H, Dikkes P, Sharpe A, McKeon F, Caput D. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature*. 2000;404:99-103.
- Yang P, Zhang J, Shi H, Zhang J, Xu X, Xiao X, Liu Y. Developmental profile of neurogenesis in prenatal human hippocampus: an immunohistochemical study. *Int J Dev Neurosci*. 2014;38:1-9.
- Yang K, Lei G, Xie YF, MacDonald JF, Jackson MF. Differential regulation of NMDAR and NMDAR-mediated metaplasticity by anandamide and 2-AG in the hippocampus. *Hippocampus*. 2014;24:1601-14.
- Yoshida M, Assimacopoulos S, Jones KR, Grove EA. Massive loss of Cajal-Retzius cells does not disrupt neocortical layer order. *Development*. 2006;133:537-45
- Young SL, Bohenek DL, Fanselow MS. NMDA processes mediate anterograde amnesia of contextual fear conditioning induced by hippocampal damage: immunization against amnesia by context preexposure. *Behav Neurosci*. 1994;108:19-29.
- Yu GJ, Hendrickson PJ, Robinson BS, Song D, Berger TW. The role of topography in the transformation of spatiotemporal patterns by a large-scale, biologically realistic model of the rat dentate gyrus. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2013;2013:5950-3
- Zamani M, Hassanshahi J, Soleimani M, Zamani F. Neuroprotective effect of olive oil in the hippocampus CA1 neurons following ischemia: Reperfusion in mice. *J Neurosci Rural Pract*. 2013 ;4:164-70.
- Zemmoura I, Velut S, François P. The choroidal fissure: anatomy and surgical implications. *Adv Tech Stand Neurosurg*. 2012;38:97-113.
- Zhao S, Chai X, Förster E, Frotscher M. Reelin is a positional signal for the lamination of dentate granule cells. *Development*. 2004 ;131:5117-25.
- Zhou JY, Crews FT. TNF alpha potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by NF kappa B inhibition. *Brain Res*. 2005 ;1034:11-24.

